

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Zelltodmarker in Ozon-exponierten A549 und L929 Zellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Johannes Josef Meyer

aus
Vilsbiburg

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. Harald Mückter

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Kirsten Lauber
Priv. Doz. Dr. Gerald Schmid
Prof. Dr. Christian Kupatt

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2016

Meinen Eltern

Irene und Johannes Meyer

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 OZON ALS PROZESSGAS	1
1.2 GRUNDLAGEN.....	2
1.2.1 PHYSIKALISCHE UND CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN	2
1.2.2 BIOLOGISCHE WIRKUNGEN	6
1.2.3 TOXIKOLOGIE UND GESUNDHEITSRISIKEN VON OZON.....	10
1.3 EINORDNUNG VON OZON-KONZENTRATIONSBEREICHEN	10
1.4 IN-VITRO-EXPOSITIONSAPPARATUREN FÜR VOLATILE GIFTE	12
1.5 OXIDATIVER STRESS UND DIMETHYLSULFOXID ALS ANTIOXIDANS	14
1.6 FRAGESTELLUNG UND ZIELE DER ARBEIT.....	14
2. MATERIAL UND METHODEN.....	16
2.1 MATERIALIEN.....	16
2.1.1 GERÄTE	16
2.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	16
2.1.3 CHEMIKALIEN	17
2.1.4 ZELLINIEN	18
2.1.5 KULTURMEDIENT UND LÖSUNGEN	18
2.2 METHODEN.....	18
2.2.1 ZELLKULTIVIERUNG	18
2.2.2 OZONEXPOSITION.....	19
2.2.2.1 Vorbereitung der Zellen	19
2.2.2.2 Ozonungsprozess.....	19
2.2.3 BIOCHEMISCHE TESTS	21
2.2.3.1 Dosimetrie.....	21
2.2.3.2 Trypanblau-Test	23
2.2.3.3 XTT-Test	23
2.2.3.4 Bestimmung des Glutathiongehaltes nach Tietze (GSX-Test).....	24
2.2.3.5 Annexin V Detection Kit	26
2.2.3.6 p53 Instant One ELISA	27

Inhaltsverzeichnis

2.2.3.7 Caspase-3,-8 und -9 Nachweis	27
2.2.3.8 JC-1 Test.....	28
2.2.3.9 Total Reactive Oxygen Species (ROS) Assay Kit	30
2.2.3.10 Bcl-2 Assay	30
2.2.3.11 CFU Assay	30
2.2.4 DIGITALE HOLOGRAFISCHE MIKROSKOPIE	30
2.2.5 VERWENDETE SOFTWARE UND STATISTIK	31
2.2.5.1 Auswertung Durchflusszytometrie	31
2.2.5.2 Statistische Methoden	31
3. ERGEBNISSE.....	33
3.1 IN-SITU DOSIMETRIE.....	33
3.1.1 BERECHNUNG DER OZONLÖSLICHKEIT	33
3.1.2 ÜBEREINSTIMMUNG VON THEORETISCHER UND GEMESSENER DOSIMETRIE.....	35
3.2 MORPHOLOGIE NACH OZONEXPOSITION	37
3.2.1 MORPHOLOGIE IM SUSPENDIERTEN MODELL.....	37
3.2.2 MORPHOLOGIE IM ADHÄRENTEN MODELL.....	40
3.3 IN-VITRO-TOXIZITÄT NACH OZONEXPOSITION	44
3.3.1 DOSIS- WIRKUNGSKURVEN ANHAND MEMBRAN- UND METABOLISCHER TOXIZITÄT	44
3.3.2 OZON INDUZIERTER CASPASE-8 AKTIVIERUNG	46
3.3.3 ANNEXIN V ALS FRÜHAPOPTOTISCHES SIGNAL AN DER ZELLMEMBRAN	50
3.3.4 ROS-BILDUNG UND EINFLUSS AUF DAS MITOCHONDRIALE MEMBRANPOTENTIAL	50
3.3.5 DNA SCHADEN UND CASPASE-3 UND -9 AKTIVIERUNG	55
3.3.6 ANTI-APOPTOTISCHE EFFEKTE	62
3.4 ANTIOXIDATIVE EFFEKTE VON DIMETHYLSULFOXID	63
3.4.1 BEEINFLUSSUNG DER PROLIFERATIONSAKTIVITÄT	63
3.4.2 EINFLUSS AUF DAS MITOCHONDRIALE MEMBRANPOTENTIAL	64
3.4.3 EFFEKT AUF DIE BILDUNG REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES.....	66
3.4.4 AUSWIRKUNG AUF DIE CASPASE KASKADE.....	68
4. DISKUSSION	70
4.1 KRITISCHE BETRACHTUNG DER VERSUCHSBEDINGUNGEN	72
4.1.1 SCHWIERIGKEITEN BEI DER EINSCHÄTZUNG DER OZONLÖSLICHKEIT	72
4.1.2 INDIREKTES EXPOSITIONSMODELL ALS METHODE DER WAHL FÜR ZELLSUSPENSIONEN ...	73
4.2 VALIDITÄT DER VERSUCHE.....	74

Inhaltsverzeichnis

4.3	PROBLEME BEI DER WAHL DER ZELLLINIEN	75
4.4	OZON UND DIE FOLGEPRODUKTE	76
4.5	ZELLTODMARKER NACH OZONEXPOSITION	79
4.6	MINDERUNG VON ZELLSCHÄDEN NACH HOCHDOSIS-OZONEXPOSITION	82
5.	FAZIT	84
	ANHANG	85
1.	BERECHNUNGEN	85
2.	TABELLENVERZEICHNIS	87
3.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	88
	LITERATURVERZEICHNIS	105
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	VI
	DANKSAGUNG	VII

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
CRP	C-reaktives Protein
DMEM-F12mix	Dulbecco's Modified Eagle Medium / Ham F12 Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
$\Delta\Psi_m$	inneres mitochondriales Membranpotential
DTNB	Bis-(4-nitrophenyl)-disulfid-3,3'-dicarbonsäure
EC	Expositions-kammer
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetracetat
FEV ₁	forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde
FVC	forcierte Vitalkapazität
GR	Glutathion-Reduktase
GPX	Glutathionperoxidase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GSX	Gesamtglutathion
HBSS	Hanks's Balanced Salt Solution
HWZ	Halbwertszeit
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LC ₅₀	mittlere letale Konzentration
LCLo	geringste bekannte letale Konzentration
LDH	Lactatdehydrogenase
MAK	Maximale Arbeitsplatz Konzentration
n.n.	nicht nachweisbar

Abkürzungsverzeichnis

NAC	N-Acetylcystein
NAD (NADH)	Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NADP (NADPH)	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
o.B.	ohne Befund
ppb	parts per billion ($1:10^9$)
ppm	parts per million ($1:10^6$)
PS	Phosphatidylserin
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SOD	Superoxiddismutase
SER	glattes endoplasmatisches Retikulum
TCA	Trichloressigsäure
TCLo	geringste bekannte toxische Konzentration
TNF	Tumornekrosefaktor
TRK	Technische Richtkonzentration
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid

1. Einleitung

1.1 Ozon als Prozessgas

Ozon ist ein hochreaktives Gas, das wegen seiner rückstandslosen Zersetzung (beim katalytischen Zerfall entsteht Sauerstoff: $2 \text{O}_3 \Rightarrow 3 \text{O}_2$) für viele Anwendungen interessant ist, in denen "aktiver Sauerstoff" von Nutzen ist. 1893 wurde das Gas zum ersten Mal in den Niederlanden für die Aufbereitung von Trinkwasser eingesetzt als Alternative zur passiven Sandfiltration – noch bevor 1908 die desinfizierende Wirkung von Chlor entdeckt wurde [EPA, 2000]. Insbesondere nach dem letzten Weltkrieg hat die Installation von Ozonanlagen in Europa stark zugenommen – mit einem rasanten Anstieg in den letzten 5 Jahren. Im März 2014 entschied das Schweizer Parlament, bundesweit die vierte Abwasserreinigungsstufe auszubauen und mit Ozonanlagen oder Pulverkohlefilter auszustatten – mit geschätzten Kosten von 1.2 Mrd CHF [Meuli, 2014].

In den USA wurde die "neue" Technologie deutlich langsamer angenommen: 1987 ging das Los Angeles Aqueduct Filtration Plant in Betrieb, das täglich ca. 600 Mio Gallonen ($600 \text{ mgd} \approx 2,2 \text{ Mio m}^3 / \text{Tag}$) Trinkwasser mit Ozon aufbereitet. Waren es 1991 in den USA erst ca. 40 Ozon-Anlagen, so stieg deren Zahl bis Ende des ersten Quartals 1998 auf 264, allerdings meist kleinere Installationen ($<1 \text{ mgd}$), und Schätzungen projektieren für 2015 rund 300 Anlagen, darunter mehrere größere [Ozone-Solutions, 2014]. Eine unvollständige Aufzählung der industriellen Anwendungen von Ozon gibt Tabelle 1-1.

Tabelle 1-1: Industrielle Anwendungen von Ozon [Rice, 1999]

- (i) Desinfektion von Wäsche im Gesundheits- und Lebensmittelbereich
- (ii) Geruchsbeseitigung in Innenräumen
- (iii) Bleichung von Farbstichen und Verfärbungen
- (iv) Flockungshilfe zur Beseitigung von Schwebstoffen
- (v) Organische Synthesen
- (vi) Aktivierung von Plastikoberflächen
- (vii) Alterungstests für Naturstoffe und synthetische Materialien

Anlagen zur Herstellung von Ozon für technische Prozesse liefern zwischen 4 und 150 g Ozon/h mit Flussraten, die die Ozonkonzentration im Sauerstoffstrom auf über 1% steigen lassen. Das sind rund 4 Größenordnungen mehr als der Ozongehalt in der Luft, der selten über 200 ppm ansteigt. Bei der Ab- und Badewasserreinigung und Trinkwasserdesinfektion benutzt man Ozonkonzentrationen von $>10000 \text{ mg/m}^3$ [Xu, 2002]. Außerdem wird Ozon zur Desinfektion von Räumen eingesetzt, um Gerüche, Bakterien, Viren und Pilzsporen zu vernichten. In diesem Bereich müssen exponierte Arbeiter geschützt werden, da Ozon bei diesen Konzentrationen in kürzester Zeit massive Schäden bewirkt und unter Umständen zum Tode führt. Von Ozonunfällen wurde in der Presse bereits berichtet, wie etwa der Ozonunfall im Stadtbad Schöneberg in Berlin (2000) [Kraetzer, 2000] oder im Laguna Badeland in Weil am Rhein (2014) [Lauber, 2014]. Mit der steigenden Zahl der Anwendungen erscheint es sinnvoll, die gesundheitlichen Risiken einer Hochdosis-Ozon-Exposition zu betrachten und experimentell anzugehen.

1.2 Grundlagen

Zum ersten Mal wurde Ozon im Jahr 1839 beschrieben. Entdecker war Christian Schönbein, der dieser charakteristisch riechenden Sauerstoffspezies den Namen Ozon – vom griechischen οζείν = riechen – gab [Schoenbein, 1913]. In seinem Bericht 1854 beschrieb Schönbein, dass Ozon bei einer Konzentration von 1 ppm durch den Geruch wahrgenommen werden kann und dass eine größere Ratte nach intensiver Ozonexposition (2 mg/m^3 Ozon) aufgrund der Reizgaseigenschaften stirbt [Schönbein, 1854].

1.2.1 Physikalische und chemische Eigenschaften

Ozon ist ein stechend riechendes, hochreaktives Gas. In der Atmosphäre tritt es mit einem Volumenanteil von ca. 30-50 ppb als Spurenstoff auf [LUBW, 2013]. Zu den natürlichen und künstlichen Vorkommen dieser Modifikation des Sauerstoffs existiert eine lange Liste. Auf der einen Seite stehen nützliche Aspekte, allen voran die le-

Einleitung

benswichtige Ozonschicht der Erdatmosphäre und die technische Verwendung zur Bade- und Abwasserreinigung. Dem gegenüber stehen auch negative Punkte wie z.B. zu hohe Ozonbelastungen während Langstreckenflügen [Markert, 2013], emissionsbedingtes, bodennahes Ozon in Städten und die Entstehung von Ozon bei Laserdruckern. Ozon ist ein bläuliches Gas, welches bei $-111,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu einer stark violetten Flüssigkeit kondensiert und bei $-198,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefriert. Die drei Sauerstoffatome des Ozons führen zu einem Molekulargewicht von 48 g/mol und einem Bindungswinkel $116,8^{\circ}$ [Hughes, 1953]. Hierbei können verschiedene mesomere Grenzstrukturen formuliert werden. Diese Resonanz erklärt die elektrophilen Eigenschaften des Ozonmoleküls (Abb. 1-1).

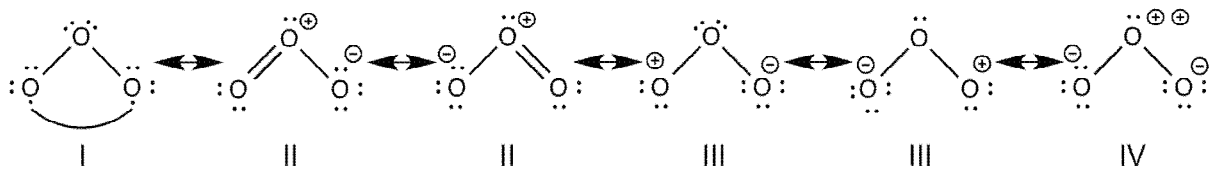


Abb. 1-1: Mesomere Grenzstrukturen des Ozonmoleküls

In Wasser ist Ozon besser löslich als Sauerstoff und bildet eine metastabile Lösung. Die Löslichkeit ist abhängig von der Temperatur und bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ zweimal so hoch wie bei Raumtemperatur (Abb. 1-2).

Einleitung

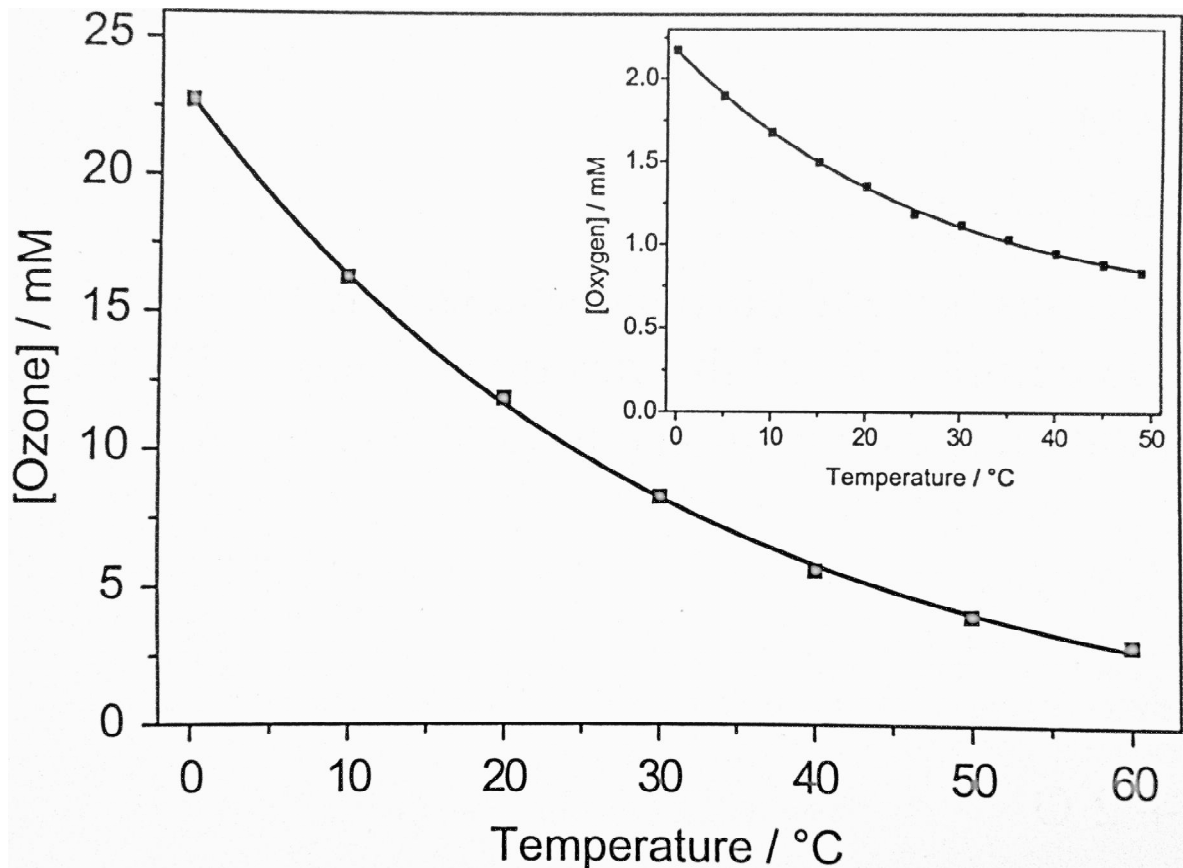
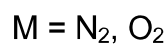
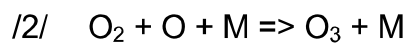


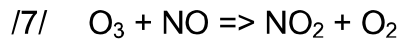
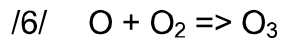
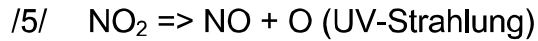
Abb. 1-2: Löslichkeit von Ozon gegenüber Sauerstoff in Wasser: Die Löslichkeit ist in Abhängigkeit zur Temperatur dargestellt [Von Sonntag, 2012].

Natürlich vorkommendes Ozon findet man in der Stratosphäre der Erde. Dort wird im sogenannten Ozon-Sauerstoff-Zyklus die UV-Strahlung im Bereich von 290-320 nm gemäß folgender Reaktionen in Wärme umgewandelt:



Daneben kommt Ozon auch in Bodennähe vor. Hier stehen dem Ozon mehr Reaktionspartner, u.a. die Stickoxide der Autoabgase, zur Verfügung:

Einleitung



Je stärker die Sonneneinstrahlung ist, desto mehr atomarer Sauerstoff und Ozon wird gebildet (Reaktionen /5/ und /6/). Die Stickoxide der Autoabgase sorgen in städtischen Gebieten für einen schnelleren Abbau von Ozon (Reaktion /7/), wodurch es in ländlichen Gebieten oftmals zu höheren O_3 -Konzentrationen kommen kann. Wie in Abbildung 1-3 ersichtlich ist die Ozonkonzentration im städtischen Raum kleiner als in ländlichen Gebieten.

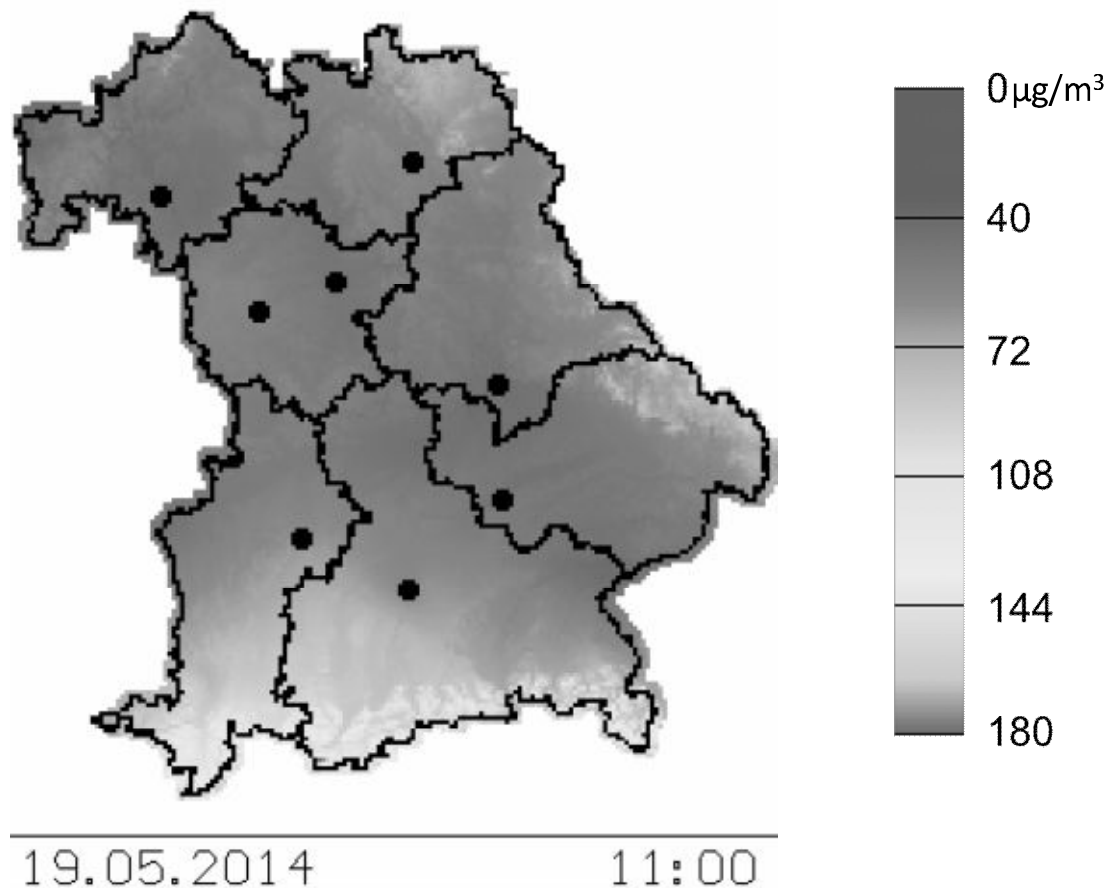


Abb. 1-3: Ozonimmissionskonzentration im Bundesland Bayern: Je dunkler blau ein Bereich ist, desto geringer ist die dortige Ozonkonzentration (siehe Farbverteilung, Angaben in µg/m³). Im Gebiet des Bayerischen Waldes sowie im Alpenvorland liegen höhere Ozonkonzentrationen vor als in städtischen Gebieten [LfU-Bayern, 2014].

Einleitung

Ozon ist ein starkes Oxidationsmittel. Das Redoxpotential beträgt 2,07 V. Außerdem handelt es sich, wie aus Abb. 1 ersichtlich, um eine 1,3-dipolare Verbindung.

Aus dieser Eigenschaft ergibt sich eine für das Ozon typische Reaktion: Die Ozonolyse einer 1,3-dipolaren [3+2]-Cycloaddition mit ungesättigten Verbindungen. Diese Reaktion ist eine gängige Methode zum Brechen von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen. Das gebildete Primärozonid zerfällt sofort in eine Keto- und Peroxoverbindung. Eine direkt anschließende, weitere Cycloaddition führt zur Bildung eines Sekundärozonids. Nach dessen Zerfall und Anwesenheit von Wasser werden zwei Carbonylverbindungen als Produkte erhalten, wie der Mechanismus in Abb. 1-4 darstellt [Criegee, 1957].

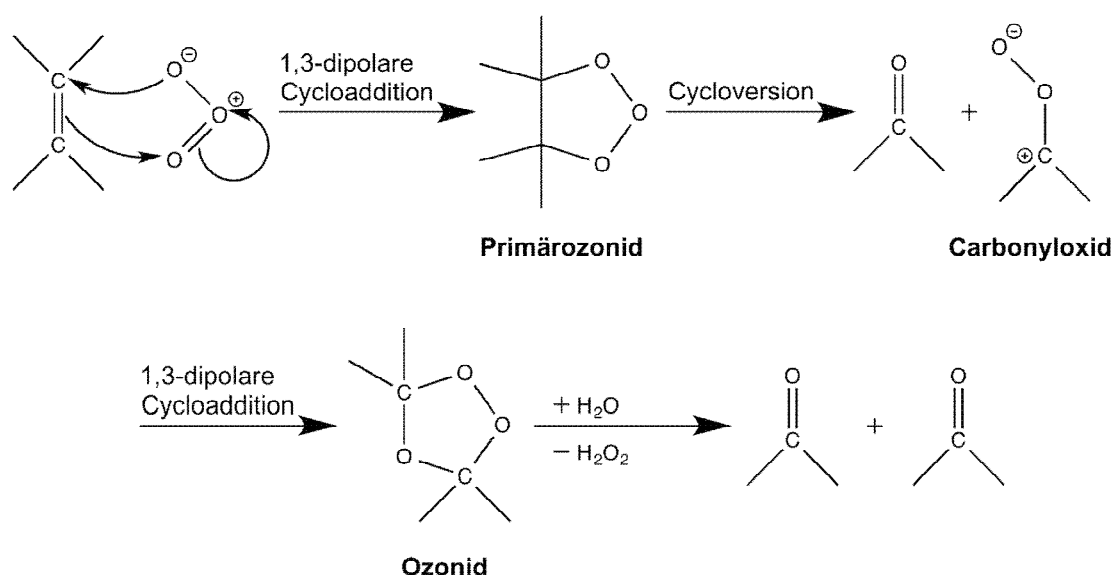


Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Ozonolyse

1.2.2 Biologische Wirkungen

Der Respirationstrakt ist das Hauptorgan, welches bei Ozonvergiftungen betroffen ist [Valacchi, 2004]. Ozon gehört zu den sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). ROS ist ein Sammelbegriff, zu dem Sauerstoffradikale wie Hydroxyl-, Superoxid- oder Peroxyradikale und nicht-radikalische oxidierende Verbindungen wie Was-

Einleitung

serstoffperoxid, hypochlorige Säure und eben Ozon zählen [Bayr, 2005]. Letztere können in radikalische Verbindungen umgewandelt werden.

Durch die reaktive Eigenschaft ist die in Abb. 1-2 dargestellte Reaktion ebenfalls an vielen Systemen im Körper denkbar, insbesondere an den ungesättigten Fettsäuren und Phospholipiden der Zellmembran. Die dabei gebildeten instabilen Ozonide zerfallen unter der Bildung von ROS, welche zytotoxisch wirken können und zu DNA-Schäden führen. Je mehr Reaktionspartner dem Ozon außerhalb der Zelle zur Verfügung stehen, umso mehr ROS werden gebildet und umso weniger tritt ein direkter Effekt von Ozon auf das Zellinnere auf [Pryor, 1992].

Ozon und die daraus gebildeten ROS führen dazu, dass die Zelle in den Zustand der Apoptose, Nekrose, Nekroptose oder Autophagie gehen kann, sowohl durch den direkten Schaden an der Zellmembran als auch durch den DNA-Schaden im Zellinneren [Kosmider, 2010].

Der DNA-Schaden beginnt mit einer Akkumulation des Tumorsuppressorgens p53 [Kastan, 1991]. Dieses Gen kontrolliert den Zellzyklus und induziert bei Zellschäden Apoptose. Zur Einleitung der Apoptose wird dabei die Kaskade der Caspasen in Gang gesetzt, die zum kontrollierten Zelltod führen. Caspasen sind Cysteinproteasen, die Peptidbindungen c-terminal von Aspartat schneiden.

Dieser intrinsische Reaktionsmechanismus wird zum einen über p53 aktiviert, was eine Cytochrom-C-Ausschüttung zur Folge hat. Zum anderen wird Cytochrom-C aber auch ausgeschüttet, sobald nach einem Ozon- bzw. ROS-Schaden das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$, Delta Psi m) kollabiert. Anschließend kommt es zur Porenbildung in der Mitochondrienmembran und zu einer Ausschüttung von Cytochrom-c. Dieses aktiviert wiederum die Initiator-Caspase-9 [Marchi, 2012].

Ozon kann über den extrinsischen Mechanismus direkt die Caspase Kaskade aktivieren, bei dem die sogenannten Todesrezeptoren der TNF-Familie an der Zellmembran beteiligt sind [Cho, 2007]. Bindet TNF an den Rezeptor, bilden sich an der Zellmembran Komplexe mit intrazellulären Adapterproteinen. An diese binden Procaspase-8-Moleküle, die sich gegenseitig durch Spaltung aktivieren. Die so aktivierte Caspase-8 regt als Initiator-Caspase weitere Procaspasen an und setzt die Caspase Kaskade in Gang.

Einleitung

Am Ende dieser Kaskade führen beide Mechanismen zur Aktivierung der Effektor-Caspase-3, die den kontrollierten Abbau der Zelle einleitet (siehe Abb. 1-5).

Einleitung

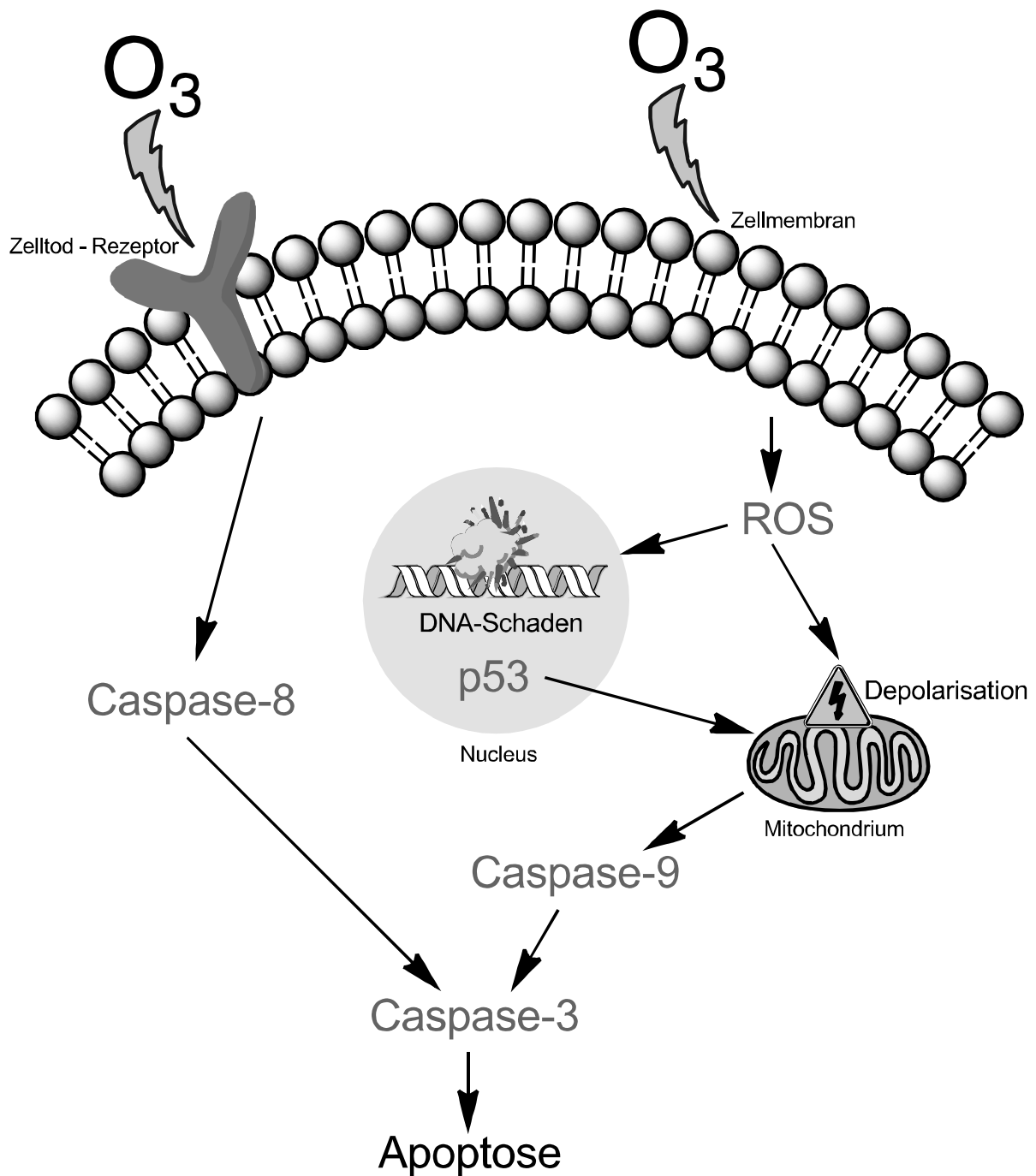


Abb. 1-5: Zelluläre Angriffspunkte von Ozon: Ozon kann direkt die Zellmembran schädigen, wodurch über Rezeptoren die Caspase 8 aktiviert wird. Ozon selbst und die aus Ozon gebildeten ROS können aber auch einen DNA-Schaden hervorrufen, was eine p53-Erhöhung, eine Depolarisation der Mitochondrienmembran und die Aktivierung der Caspase-9 zur Folge hat. Beide Wege erreichen die Caspase-3, deren Aktivierung den programmierten Zelltod begleitet.

1.2.3 Toxikologie und Gesundheitsrisiken von Ozon

Ozon führt bei Kontakt und inhalativer Aufnahme zu Intoxikationserscheinungen. Nach ICD-10-GM-2014 wird diese Vergiftungserscheinung kodiert als T59.8: Toxische Wirkung: Sonstige näher bezeichnete Gase, Dämpfe oder sonstiger näher bezeichneter Rauch [DIMDI, 2013]. Das reaktive Ozon gelangt bis in die tiefen Atemwege [Hu, 1992]. Hier tritt die primäre Schädigung auf, wobei letztlich Bronchiolen, Alveolen und Lungenkapillaren betroffen sind. Weiterhin kommt es zu Symptomen im gesamten Respirationstrakt. Bei inhalativer Aufnahme treten zunächst Symptome wie Schleimhautirritation, Atemnot, Husten, Laryngospasmus und Bronchokonstriktion auf [Hazucha, 1992; Miller, 1985]. Dosisabhängig kommt es zu Entzündungsreaktionen in der Lunge, was zu einer Erhöhung von systemischen Entzündungsmarkern wie CRP und Serumamyloid führen kann. Des Weiteren ist auch eine Verschlechterung funktioneller Parameter, z.B. des FEV₁- und FVC-Werts typisch [Jörres, 2000; Samet, 2001].

Je nach Schweregrad der Entzündung kann es zur Ateminsuffizienz, zum Lungenödem oder zur irreversiblen Lungenfibrose kommen. Dies konnte im Mausmodell gezeigt werden [Katre, 2011]. Der Ersatz des untergegangenen, funktionellen Lungengewebes durch Bindegewebe reduziert in diesem Stadium den suffizienten Sauerstoffaustausch. Als Therapie bleibt in diesem Fall nur noch die Lungentransplantation.

1.3 Einordnung von Ozon-Konzentrationsbereichen

Um eine Einordnung von Ozonkonzentrationen mit der in den eigenen Versuchen verwendeten Ozonkonzentration vorzunehmen, sind in Tabelle 1-2 verschiedene Ozonkonzentrationen und ihre Auswirkungen angegeben.

Der seit 1958 geltende MAK-Wert (Maximale Arbeitsplatzkonzentration) betrug 200 mg/m³ und bezog sich lediglich auf die schleimhautreizende Wirkung des Ozons. Auf Grund von Hinweisen auf eine krebserregende Wirkung und das genotoxische Potential von Ozon wurde 1995 der MAK-Wert ausgesetzt.

Einleitung

Tabelle 1-2: Ozon in der Umwelt in aufsteigender Konzentration

Ozon in der Atemluft [mg/m ³]	Vorkommen	Dauer [h]	c-t-Produkt [(mg/m ³)h]	Wirkung	Literatur
0,03 – 0,04	Geruchsschwelle				[Cain, 2007]
0,02 – 0,15	Laserdrucker				[Maddalena, 2011]
0,15	Mensch	6,6	0,99	Husten, respiratorische Depression	[McDonnell, 1991]
0,18	Flugpassagier	4	0,72	Kopfschmerzen, Augenreizungen	[Strøm-Tejsen, 2007]
0,18	Infoschwelle	1	0,18		[Europäisches Parlament, 2008]
0,24	Alarmschwelle	1	0,24		[Europäisches Parlament, 2008]
0,4	Mensch	4	1,6	Oxidativer Stress, Lipidperoxidation	[Chen, 2007]
0,78	Mensch	2	1,56	Entzündungsreaktion der Lunge	[Samet, 2001]
5,3	Maus	36	190	Lethale Konzentration	[Johnston, 1999]
400 – 20000 Gasphase 90 – 4000 Flüssigphase	Ozongenerator (eigener Versuchsaufbau)	1		Siehe Abschnitt 3. Ergebnisse	
30000	Trinkwasseraufbereitung	0,12	3600	Abwasserdesinfektion	[Xu, 2002]

Hervorzuheben sind vor allem die Schwellenwerte der Ozonkonzentration, die in der EU-Richtlinie über Luftqualität und saubere Luft für Europa festgelegt sind [Europäisches Parlament, 2008].

Hier existieren der Schwellenwert zur Unterrichtung der Bevölkerung ($0,18 \text{ mg/m}^3$ Ozon als 1-Stunden-Mittelwert) und der Schwellenwert für die Auslösung von Ozon – Warnungen ($0,24 \text{ mg/m}^3$ Ozon als 1-Stunden-Mittelwert).

Die MAK- und BAT-Werte-Liste der Deutschen Forschungsgemeinschaft stuft Ozon als krebserzeugenden Arbeitsstoff in die Kategorie 3b ein. Dies bedeutet, dass aus In-vitro- oder aus Tierversuchen Anhaltspunkte für eine krebserzeugende Wirkung vorliegen, die jedoch zur Einordnung in eine andere Kategorie nicht ausreichen. Zur endgültigen Entscheidung sind weitere Untersuchungen erforderlich. Sofern der Stoff oder seine Metaboliten keine genotoxischen Wirkungen aufweisen, kann ein MAK- oder BAT-Wert festgelegt werden [DFG, 2013]. Im Jahr 1998 wurde der MAK-Wert durch einen TRK-Wert (technische Richtkonzentration) von 200 mg/m^3 ersetzt [LfU-Bayern, 2013].

1.4 In-vitro-Expositionsapparaturen für volatile Gifte

Zur Vermeidung unnötiger Tierversuche fordert die neue Chemikalienverordnung REACH (**R**egistration, **E**valuation, **A**uthorisation and **R**estriction of **C**hemicals) die Nutzung „alternative[r] Methoden zur Bewertung von Stoffen“ [Rovida, 2009; Bunke, 2012]. Schon seit längerem, aber besonders seit der Einführung dieser Verordnung, werden im Bereich der inhalativen Toxikologie In-vitro-Apparaturen beschrieben, die es ermöglichen, volatile Gifte und Feinstäube an isolierten Zellen zu testen. Dabei sollten Expositionsbedingungen der zellulären Systeme denen der Lunge in-vivo möglichst ähnlich sein, um Rückschlüsse von In-vitro- auf In-vivo-Bedingungen ziehen zu können.

Eine Möglichkeit ist die direkte Methode oder auch "air-liquid interface" genannt, bei der die Zellen auf einer porösen Membran wachsen [Ritter, 2001]. Zu dieser Methode zählt das patentierte Expositionssystem Cultex®. Dieses ermöglicht den unmittelbaren Kontakt von Testgas und Zellen, was bereits für humane Lungenfibroblasten

Einleitung

(Lk004 Zellen) und humane Lungenepithelzellen (HFBE-21 Zellen) gegenüber Ozon beschrieben wurde [Ritter, 2001]. Nachdem das Medium entfernt worden ist, können die Zellen auf der Membran der Testsubstanz ausgesetzt werden und sind zur gleichen Zeit durch das Nährmedium unterhalb der Membran versorgt. Dieses System eignet sich auch zur Untersuchung anderer volatiler Gifte, Zigarettenrauch [Aufderheide, 2013] oder Mikro- und Nanopartikel [Steinritz, 2013].

Eine Variante ist das Vitrocell® System. Dabei wachsen die Zellen ebenfalls wie im Cultex System auf einer porösen Membran und werden durch Medium unterhalb der Membran versorgt. Die Zellen stehen im direkten Kontakt mit der toxischen Substanz wie z.B. Zigarettenrauch [Thorne, 2013].

Vitrocell® und Cultex® bieten die Möglichkeit, die Zellen kontinuierlich mit frischem Medium oder mit statischem Medium, welches nicht gewechselt wird, zu versorgen. Des Weiteren ist es bei beiden Modellen möglich, ein sogenanntes 3D-Zellmodell zu begasen. Dabei wachsen in einer Co-Kultur oberhalb der Membran z.B. Epithelzellen und unterhalb der Membran Makrophagen oder Endothelzellen.

Neben der direkten Methode gibt es noch die indirekte Methode, bei der ein Flüssigkeitsfilm zwischen Testgas und Zellen vorliegt. Die Zellen wachsen auf einer Membran an und sind durch Medium bedeckt. Die Zellen stehen somit nicht in unmittelbarem Kontakt zur Testsubstanz. Diese muss zunächst in dem Medium gelöst werden, bevor es auf die Zellen trifft. Die Methode wurde für Lungenzellen aus der Ratte nach Ozonexposition beschrieben [Wenzel, 1979].

Die im vorliegenden Versuchsaufbau verwendete Apparatur arbeitet nach der indirekten Methode. Bei dieser und ebenso bei den anderen Methoden sollte darauf geachtet werden dass Medien bzw. Puffer mit wenig Zusatz gewählt werden, damit keine Reaktion der Testsubstanz mit der Lösung stattfindet. Die Exposition erfolgt in Standardzellkulturflaschen [Mückter, 1998]. Die Apparatur wurde ursprünglich für die In-vitro-Untersuchung von Narkosegasen entwickelt. Die Details zum Versuchsaufbau sind in Abschnitt 2.2.2.2 genauer aufgeführt.

Beide Methoden bieten Vor- und Nachteile, welche im Laufe dieser Arbeit noch diskutiert werden.

1.5 Oxidativer Stress und Dimethylsulfoxid als Antioxidans

Die in 1.1.2 genannten oxidativen Sauerstoffverbindungen führen im menschlichen Körper zu Gewebeschäden, da sie hochreaktive Moleküle darstellen und mit zellulären Strukturen reagieren. Antioxidantien sind Substanzen, die den Organismus vor eben solchen unerwünschten oxidativen Schäden schützen. Man unterscheidet zwischen enzymatischen und nicht enzymatischen Antioxidantien.

Bei den enzymatischen Antioxidantien sind zu allererst die Superoxiddismutase (SOD), die Glutathionperoxidase (GPx) und die Katalase zu nennen. Zu den nicht enzymatischen Antioxidantien gehören Verbindungen wie Glutathion, Vitamin C/E, Karotinoide, N-Acetylcystein (NAC) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) [Valko, 2007]. Unter physiologischen Umständen herrscht ein Gleichgewicht zwischen den natürlich vorkommenden ROS und den Antioxidantien. Ein ROS-Überschuss stellt einen pathologischen Zustand dar, der auch bei Ozonvergiftungen auftritt [Voter, 2001]. Diesem Zustand kann durch die antioxidative Eigenschaft von DMSO entgegengewirkt werden. DMSO führt zu einer verminderten Bildung von Hydroxylradikalen und einer geringeren Lipidperoxidation und Proteinoxidation. Dies wurde bei Hirnzellen von Ratten für Wasserstoffperoxid [Sanmartin-Suarez, 2011] und bei der A549-Zelllinie für proinflammatorische Zytokine gezeigt [Muroya, 2012].

1.6 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Zur Untersuchung der biologischen Wirkungen des Ozons in hohen Konzentrationen stand eine Versuchsanlage zur Verfügung, die ursprünglich für In-vitro-Studien mit volatilen Anästhetika konzipiert worden war. Die Adaptierung dieser Apparatur an das aggressive Ozon war die erste Herausforderung auf dem Weg zur Untersuchung solcher Konzentrationen. Hinzu kam die Suche nach geeigneten Methoden zur Dosimetrie, nachdem Pilotversuche gezeigt hatten, dass die am Ozongenerator eingestellten Werte keineswegs zu den Expositionsdaten passten. Offenbar war der Strömungstransport des Gases auch über kurze Entfernungen verlustreich, so dass eine Dosimetrie von Ozon am Ort der Einwirkung nötig war.

Einleitung

Ferner sollte die Toxizität von Ozon anhand der Zelllinien A549 und L929 bei Adhärenz und in Suspension getestet werden. Als Endpunkte dienten metabolische Parameter (Glutathionvorrat und Formazanbildung) und die Schädigung der Zellmembran.

Weiteres Ziel war die Beobachtung und Dokumentation der Art und des Ablaufs der Zellschädigung in den beiden Indikatorzelllinien. Die Untersuchung typischer Apoptosekomponenten sollte Aufschluss darüber geben, welche Signalkaskaden aktiviert werden. Für die in den "low-dose exposure" üblichen Parameter war bislang nicht bekannt, ob sie auch unter den Bedingungen einer Exposition gegenüber technischen Ozon-Konzentrationen aussagekräftig waren. Dabei sollte der extrinsische oder intrinsische Apoptose-Weg untersucht werden.

Schließlich wurde an beiden Zelllinien die Wirkung von DMSO bei einer Ozonexposition wegen seiner antioxidativen Eigenschaften getestet.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

- Ozongenerator und Ozonanalysator Ozomat Com; Fa. Anseros, Tübingen
- CO₂-Brutschrank; Fa. Heraeus, Hanau
- Wärmeschrank Expositionsapparatur; Fa. Heraeus, Hanau
- Zentrifuge Rotanta; Fa. Hettich, Tuttlingen
- Neubauer-Zählkammer; Fa. Brand, Wertheim
- Sterilbank LB-72-C Lamin Air; Fa. Heraeus, Hanau
- Lichtmikroskop Axiovert 135M; Fa. Zeiss, Göttingen
- UV/Vis Spektrometer, Pharmacia LKB Biochrom 4060
- Holomonitor M3; Fa. IUL Instruments, Königswinter
- Mikrotiterplattenlesegerät Wallac Victor³ 1420; Fa. Perkin Elmer
- Durchflusszytometer FACSCalibur flow cytometer, Fa. BD Biosciences; Heidelberg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

- Zellkulturflaschen, 50mL & 250mL; Fa. Nalge-Nunc
- 96 & 6 Lochplatten; Fa. Nalge-Nunc
- Falkongefäße (15, 50 ml); Fa. Nalge-Nunc
- Durchflusszytometrie Röhren 5mL; Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- Pipettenspitzen (10, 100, 1000 µl); Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- Reaktionsgefäße (1,5, 2 ml); Fa. Sarstedt, Nümbrecht

2.1.3 Chemikalien

- Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC; Fa. eBioscience, Frankfurt
- Carbogen (95% O₂ + 5% CO₂); Fa. Linde, Pullach
- CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase-3 Staining Kit; Fa. eBioscience, Frankfurt
- CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase-8 Staining Kit; Fa. eBioscience, Frankfurt
- CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase-9 Staining Kit; Fa. eBioscience, Frankfurt
- Cell proliferation kit II (XTT); Fa. Roche, Mannheim
- Dimethylsulfoxid (DMSO); Fa. Merck, Darmstadt
- Dimethylsulfon (DMSO₂); Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- 1,9-Dimethyl-Methylenblau; Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- 2,2'-Dinitro-5,5'-dithiobenzoessäure (DTNB); Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Fixable Viability Dye eFluor® 450; Fa. eBioscience, Frankfurt
- Glutathion (GSH); Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Glutathion-Reduktase; Fa. Roche, Mannheim
- Human Bcl-2 Platinum ELISA; Fa. eBioscience, Frankfurt
- Human p53 Platinum ELISA; Fa. eBioscience, Frankfurt
- Indigokarmin, Reinheit ≥ 85%; Fa. Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Dye; Fa. eBioscience, Frankfurt
- NADPH; Fa. Roche, Mannheim
- Oxidiertes Glutathion (GSSG); Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- p53 Instant One™ ELISA; Fa. eBioscience, Frankfurt
- Perchlorsäure 70-72%; Fa. Merck, Darmstadt
- Total Reactive Oxygen Species (ROS) Assay Kit; Fa. eBioscience, Frankfurt
- Triethanolaminhydrochlorid; Fa. Merck, Darmstadt
- Triethanolamin reinst.; Fa. Merck, Darmstadt
- Trypanblau; Fa. Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

2.1.4 Zelllinien

- A549 (ATCC® CCL-185™):
 - Ursprung: human (♂, 58j), Lungenkarzinom-Gewebe
 - Zelltyp: adhärenente Alveolarepithelzellen Typ II
- NCTC clone 929, L929 (ATCC® CCL-1™):
 - Ursprung: C3H/An Maus (♂, 100d), areolares Fettgewebe
 - Zelltyp: adhärenente Fibroblasten

2.1.5 Kulturmedien und Lösungen

- Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM); Fa. Invitrogen, Karlsruhe, versetzt mit 2%, 5% oder 10% fötalem Kälberserum (FCS), 2mM Glutamin, 100 IU/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin
- Hanks`s Balanced Salt Solution (HBSS); Gibco, Fa. Invitrogen, Karlsruhe
- Phosphate-Buffered Saline (PBS) pH 7.4; Gibco, Fa. Invitrogen, Karlsruhe
- DMEM ohne Phenolrot; Fa. Invitrogen, Karlsruhe
- Trypsin-Lösung: 2,5% in PBS; Gibco, Fa. Invitrogen, Karlsruhe

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultivierung

Die Zellen der Linien A549 und L929 wurden in einem Inkubator (37°C, 7,5%CO₂, wasserdampfgesättigt) in kontinuierlicher Kultur vermehrt. Dafür wurden die entsprechenden Zellen in 250 mL Zellkulturflaschen der Firma Nalge-Nunc mit 20 mL Kulturmedium (DMEM-Lösung) ausgesät. Zur Vermeidung einer bakteriellen Kontamination war dem Medium zuvor Penicillin (100 IE/mL) und Streptomycin (50 µg/mL) zugesetzt worden. Die tägliche mikroskopische Beobachtung der Zellen diente der Kontrolle des adhärenenten Wachstums. Bevor es zur Ausbildung eines dichten Mo-

nolayer und Kontaktinhibition durch die Zellen kam, wurden diese in einem Verhältnis von etwa 1:5 folgendermaßen geteilt: Nach dem Absaugen des Kulturmediums wurde der Zellrasen mit 5 mL HBSS gewaschen und anschließend die Zellen durch die Zugabe von 3 mL Trypsin-Lösung und 20-minütiger Inkubation im Brutschrank von der Oberfläche abgelöst. Die abgelösten Zellen in der Trypsin-Lösung wurden mit 5mL DMEM-Lösung zur Inaktivierung versetzt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 1500rpm = 300g wurde der flüssige Überstand abgesaugt und das zurückgebliebene Zellpellet in 5mL DMEM-Lösung resuspendiert und jeweils 1 mL in neue Kulturflaschen überführt. Diese enthielten 19mL Kulturlösung bei der Verwendung von 250 mL Zellkulturflaschen oder im Fall der kleineren 50 mL Zellkulturflaschen, wie sie bei den Ozonierungsversuchen eingesetzt wurden, 3 mL Kulturmedium.

2.2.2 Ozonexposition

2.2.2.1 Vorbereitung der Zellen

Vor Versuchsbeginn wurden die kultivierten Zellen mit 2 mL Trypsin-Lösung abgelöst und mit 5 mL DMEM-Lösung neutralisiert. Nach Zentrifugation und Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 mL HBSS resuspendiert und jeweils 1 mL in eine 50 mL Zellkulturflasche überführt, in der bereits 2 mL HBSS vorgelegt waren. Standardmäßig wurde jeweils eine Kulturflasche als Brutschrank-, Carbogen- bzw. Negativkontrolle, eine Kulturflasche als Positivkontrolle (H_2O_2) und eine Kulturflasche als Ozonprobe verwendet. Bei den Versuchen mit Antioxidantien (siehe Abschnitt 3.4) wurden zu den 3 mL Zellsuspension in den Zellkulturflaschen zusätzlich entweder DMSO, DMSO_2 oder Urea (jeweils 1%) zugegeben.

2.2.2.2 Ozonungsprozess

Wie in Abb. 2-1 ersichtlich, wurde Ozon aus Carbogen-Gas (95% O_2 + 5% CO_2) in einem Ozongenerator mittels gepulster Hochspannung in einer Gasentladungsröhre

generiert. Dabei wurde Carbogen direkt über eine Wirbelkammer zum Ozongenerator geleitet. Vom Ozongenerator gelangte das Gas über eine Reihe von Waschflaschen, die der Anfeuchtung des Gases dienten, zu einem Verteilerkreuz und von dort zu den drei Plattformen der Expositions-kammer, welche in einem Wärmeschrank bei 37°C untergebracht war. Hier fand die Begasung der Zellen statt. Die kultivierten Zellen waren in 50mL Standardzellkulturflaschen auf drei parallelen Plattformen verteilt, wobei jeweils vier Flaschen pro Plattform in Serie geschaltet waren. Jede Plattform verfügte über eine eigene Zu- und Ableitung, und jede Flasche konnte manuell entweder dem Ozonstrom („in-line“) oder der Wärmeschrankatmosphäre („offline“) ausgesetzt werden. Die Expositions-kammer konnte zusätzlich geschaukelt werden (siehe Abbildung 2-2), sodass ein Anwachsen der Zellen verhindert wurde und diese in Suspension blieben. Von der Expositions-kammer aus gelangte der Gasstrom zur Verringerung des Feuchtigkeitsgehaltes über eine eisgekühlte Kühlfalle in das Ozonmessgerät, wo die Ozonkonzentration über einen angeschlossenen Analysator photometrisch bei 253,7 nm gemessen wurde. Von dort aus gelangte der Gasstrom nach katalytischer Zerstörung restlicher Ozonanteile in den Abzug.

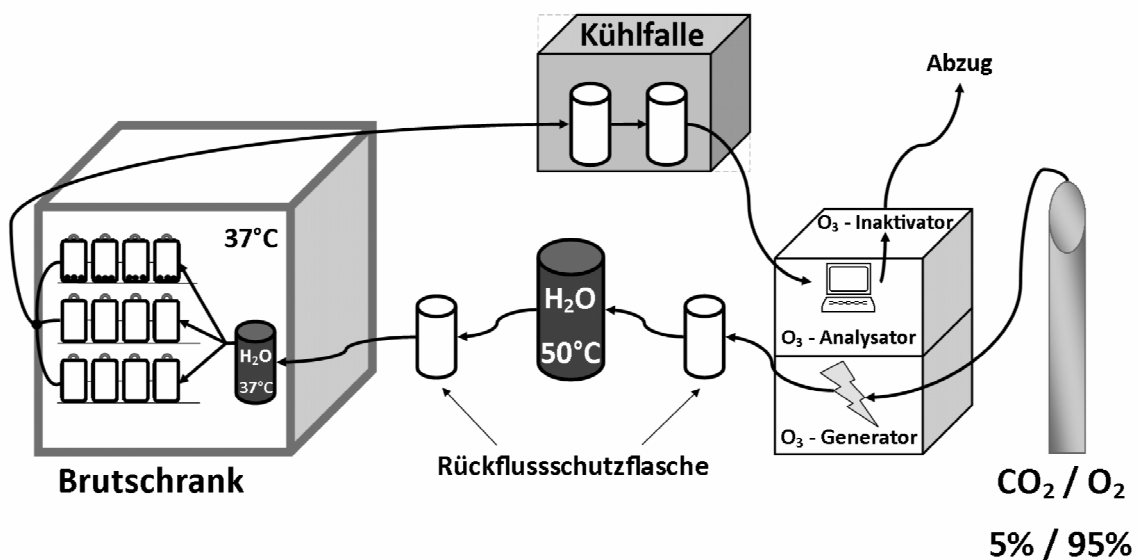


Abb. 2-1: Schematischer Aufbau der Expositionsanlage: Von der Carbogenflasche gelangte das Trägergas in den Ozon-Generator und von dort aus in den Brutschrank. Dort fand die Begasung der Zellen statt. Anschließend lief der Gasstrom über eine Kühlfalle in den Ozon-Analysator.

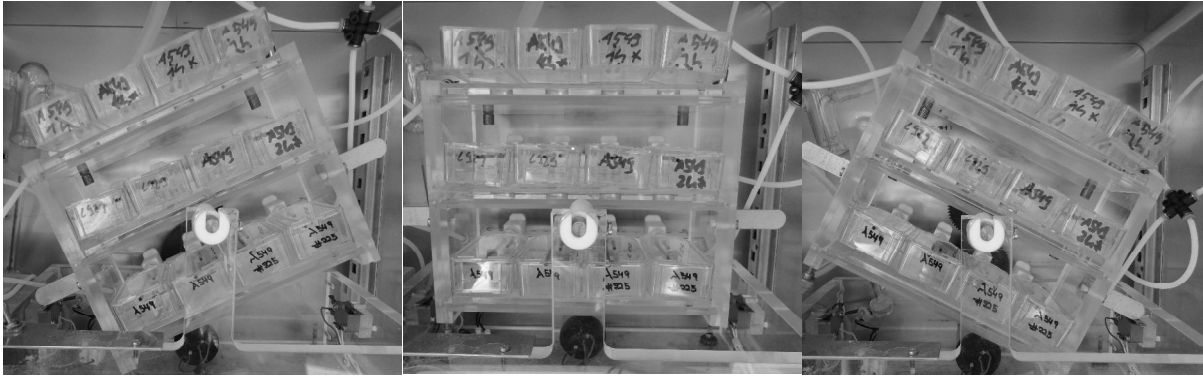


Abb. 2-2: Auslenkbewegung der Expositions-kammer: A549 und L929 Zellen wurden durch langsames Schaukeln von links nach rechts in den Kulturflaschen in Suspension gehalten.

Vor einem Ozonungsprozess wurde zunächst zur richtigen Einstellung der Ozonkonzentration ein kurzer Kreislauf gewählt, bei dem der Ozonstrom direkt aus dem Generator in den Analysator verlief. Anschließend wurde wie oben beschrieben der große Kreislauf angeschlossen.

2.2.3 Biochemische Tests

2.2.3.1 Dosimetrie

Aufgrund der unterschiedlichen Ozonkonzentration in Gas- und Flüssigphase musste zunächst mittels einer geeigneten Methode die Konzentration an gelöstem Ozon ermittelt werden. Dafür stehen chemische und optische Methoden zur Verfügung. Für das vorliegende Expositionsmodell eignete sich am besten die photometrische Methode mit Indigokarmin [Bader, 1982]. Indigokarmin besitzt ein spezifisches Absorptionsmaximum bei 610 nm und reagiert spezifisch mit Ozon unter der Bildung von 2 Molekülen Isatin wie in Abbildung 2-3 ersichtlich ist.

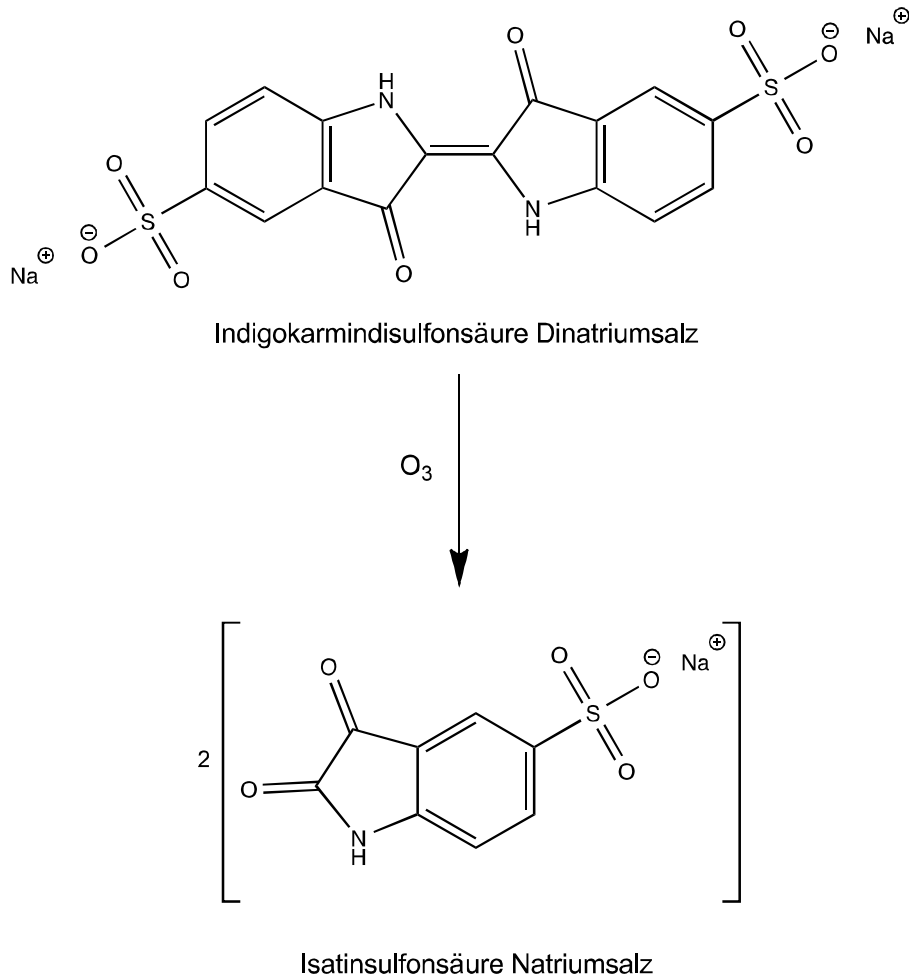


Abb. 2-3: Reaktionsmechanismus von Indigokarmin mit Ozon

Diese Reaktion sollte allerdings nur solange linear proportional laufen bis rund 1/3 des Farbstoffs ausgebleicht ist, da aufgrund weiterer Reaktionen von Ozon mit Isatin keine 1:1 Stöchiometrie mehr gewährleistet ist [Kettle, 2004].

Indigokarmin wurde zur Bestimmung der Ozonwerte in einer Konzentration von 0,5 mM in HBSS gelöst, 3 mL der Lösung in eine 50 mL Standardzellkulturflasche überführt und mit Ozon behandelt. Die Absorption der Indigokarminlösung wurde anschließend photometrisch bestimmt und die Konzentration über das Lambert-Beer-Gesetz berechnet.

2.2.3.2 Trypanblau-Test

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl nach Ozonexposition wurde eine Teilmenge der Proben in 1 mL HBSS mit 20 μ L 0,18% Trypanblau-Lösung versetzt. Trypanblau kann die Zellmembran toter Zellen überwinden und färbt diese dunkel. Nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur wurden 10 μ L Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer übertragen und die Gesamtzellzahl sowie das Verhältnis von ungefärbten lebenden Zellen und angefärbten toten Zellen durch manuelles Zählen der 4 Quadranten unter dem Mikroskop bestimmt. Der Mittelwert multipliziert mit 10^4 ergab die Zellzahl/mL.

2.2.3.3 XTT-Test

Der XTT-Test basiert auf der Fähigkeit metabolisch aktiver Zellen, das Tetrazoliumsalz XTT in einen Formazan-Farbstoff umzuwandeln. Diese in Abbildung 2-4 dargestellte Reaktion setzt die Anwesenheit von NAD(P)H und mitochondrialen oder cytosolischen Dehydrogenasen voraus. Durch die Reduktion der Verbindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 380 auf 470 nm (orange). Die Konzentration des entstandenen Farbstoffs kann photometrisch quantifiziert werden und erlaubt einen direkten Rückschluss auf die Lebendzellzahl.

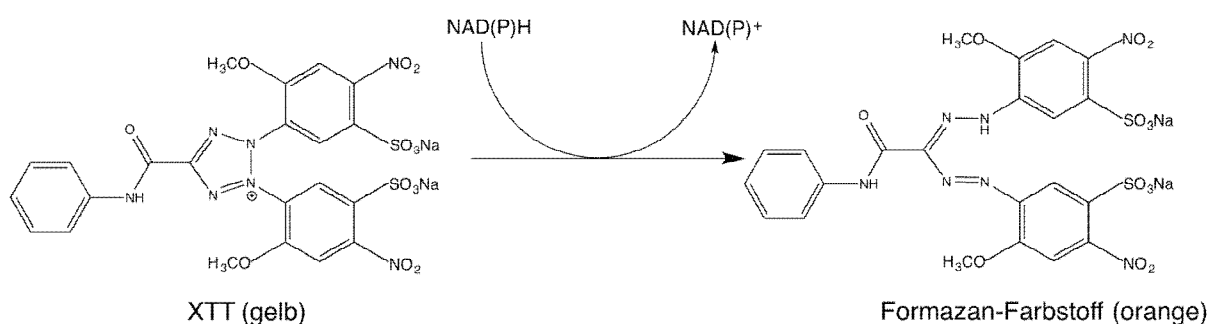


Abb. 2-4: Farbgebende Reaktion des XTT-Tests

Zur Auswertung der Lebendzellzahl nach der Ozonierung der Zellkulturen wurden für den XTT-Test Mikrotiterplatten mit 96 Wells verwendet. Nach Exposition wurden die

Zellen zentrifugiert und das Pellet in 2mL farbloser DMEM-Lösung ohne Phenolrot resuspendiert. Die Zellzahl wurde auf 10^6 Zellen/mL eingestellt. Je 100 μ L der entsprechenden Zellsuspension in farbloser DMEM-Lösung wurden mit 100 μ L der Lösung des Tetrazoliumsalz (6 mL HBSS, 5 mL XTT Reagenz, 160 μ L Kupplungsreagenz) gemischt. Die Mikrotiterplatten wurden anschließend zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die photometrische Auswertung am Mikrotiterplattenlesegerät Wallac Victor³.

2.2.3.4 Bestimmung des Glutathiongehaltes nach Tietze (GSX-Test)

Glutathion (GSH) ist ein in Zellen ubiquitär vorkommendes Tripeptid aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin, welches im Körper als Antioxidans fungiert. In der oxidierten Form (GSSG) liegen zwei über eine Disulfidbrücke verknüpfte Glutathionmoleküle vor. Die Rückgewinnung von GSH erfolgt durch die von dem Enzym Glutathion-Reduktase (GR) katalysierte Reduktion unter Verbrauch von NADPH. Die Konzentration an GSH und GSSG in den Zellen dient bei diesem Test als Indikator für die Lebendzellzahl, da geschädigte Zellen keinen oder nur noch einen eingeschränkten Metabolismus zeigen und damit einhergehend die Aktivität der Glutathion-Reduktase gedrosselt bzw. nicht mehr vorhanden ist.

Der intrazelluläre Glutathiongehalt wurde mittels des Tietze-Assays, modifiziert nach Eyer, bestimmt [Eyer, 1986]. Reduziertes Glutathion (GSH) reagiert mit DTNB zu oxidiertem Glutathion (GSSG) und 2-Nitro-thiobenzoat, das bei einer Wellenlänge von 412 nm photometrisch bestimmt werden kann. GSSG wiederum wird durch die Glutathion-Reduktase (GR) unter Verbrauch von NADPH/H⁺ zu GSH reduziert. Je mehr Glutathion vorhanden ist, desto schneller färbt sich der Reaktionsansatz gelb.

Da bei der verwendeten Methode der Gesamtglutathiongehalt bestimmt wird, also die reduzierte plus die oxidierte Form, spricht man auch vom GSX-Test.

Durch die Erstellung einer Eichkurve (siehe Tab. 2-1) mit definierten Konzentrationen von GSH konnten dann bei photometrischer Messung der Proben bei 412 nm die Zunahme der Extinktionswerte einer Konzentration an GSH zugeordnet werden.

Tabelle 2-1: Verdünnungsreihe zur Erstellung der Eichkurve

<i>Konzentration</i>	<i>GSSG (250 μM)</i>	<i>Perchlorsäure (0,33 M)</i>
100 μM	400 μ L	600 μ L
80 μM	320 μ L	680 μ L
60 μM	240 μ L	760 μ L
40 μM	160 μ L	840 μ L
20 μM	80 μ L	920 μ L
0 μM	0 μ L	1000 μ L

Da die Reaktion pH-abhängig ist und die Zugabe von Perchlorsäure einen zu niedrigen pH-Wert zur Folge hatte, wurde jede Probe anschließend durch die Zugabe von 100 μ L einer Mischung aus Triethanolamin und Glutathionpuffer (1:1) auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Die anschließende Messung der Extinktion wurde am UV/Vis Spektrometer bei 412 nm in Zeitintervallen von 30 Sekunden über drei Minuten durchgeführt. Die Zusammensetzungen der in die Glasküvetten gegebenen Lösungen ist Tabelle 2-2 zu entnehmen.

Tabelle 2-2: Pipettierschema für die photometrische Glutathionbestimmung

<i>Volumen in der Probe</i>	<i>Reagenz</i>
850 μL	Glutathionpuffer
50 μL	Eichkurve-Probe (0-100 μ M) Ozon-Probe
50 μL	NADPH (4,1 mg/mL Glutathionpuffer)
20 μL	DTNB (3 mg/mL Glutathionpuffer)
30 μL	Glutathion-Reduktase (30 μ L/mL Glutathionpuffer)

Nach Ozonexposition wurde 1 mL der Zellsuspension zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zuerst in 2 mL kalter Perchlorsäure inkubiert um die Zellen aufzuschließen. Danach wurden 200 µL entnommen und mit je 20 µL Triethanolamin/Glutathion-Gemisch auf pH 7 neutralisiert. Die so behandelte Probe wurde dann analog zu den Proben der Eichkurve behandelt und ebenfalls photometrisch vermessen.

2.2.3.5 Annexin V Detection Kit

Annexin V dient zur Markierung frühapoptotischer Zellen. Es bindet an Phosphatidylserin, ein Phospholipid, welches sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle befindet [Castedo, 1996]. Während der Apoptose wird Phosphatidylserin von der Innenseite auf die Außenseite der Zellmembran transloziert, wodurch Annexin V in Anwesenheit von Ca^{2+} an Phosphatidylserin bindet. Werden Zellen geschädigt und ihre Membran durchlässig, kann Annexin V in die Zellen eindringen und an die Innenseite der Membran binden. Daher können bei alleiniger Färbung von Zellen mit Annexin V apoptotische nicht von nekrotischen Zellen unterschieden werden. In Kombination mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fixable Viability Dye eFluor® 450 (FVD) können vitale apoptotische und nekrotische Zellen voneinander abgegrenzt werden, da dieser nur die poröse Membran toter Zellen durchdringen kann, dort an Proteine im Zellinneren bindet und damit nur nekrotische Zellen färbt.

Die Zellsuspension wurde nach Exposition zentrifugiert, 2-mal mit je 200 µL PBS gewaschen und in 1 mL PBS resuspendiert. Zur Färbung mit Fixable Viability Dye eFluor® 450 wurden 0.3 µL Fixable Viability Dye gegeben und für 30 min bei 0°C inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschriff mit 200 µL PBS. Anschließend wurden die Proben zur Färbung mit Annexin V 2-mal mit je 200 µL Protein-containing Buffer und einmal mit 200 µL Binding Buffer gewaschen. Zur Färbung wurden die Zellpellets in 500 µL Binding Buffer resuspendiert und mit 2.5 µL Annexin V FITC versetzt. Es wurde 15 min in der Dunkelheit bei RT inkubiert. Die Zellen wurden 1-mal mit 200 µL Binding Buffer gewaschen und in 500 µL Binding Buffer resuspendiert. Die Vermessung der Proben erfolgte am Durchflusszytometer FACSCalibur.

2.2.3.6 p53 Instant One ELISA

Die Auswirkung von Ozon und den gebildeten ROS auf die DNA kann durch das Tumorsuppressorgen p53 überprüft werden. Die Bestimmung des zellulären p53-Gehalts erfolgte mit Hilfe des p53 Instant One ELISA Kits in einer 96-well Platte. Nach der Exposition wurden die Zellen 2-mal mit HBSS gewaschen und in der Neubauerkammer ausgezählt. Die Zellzahl wurde auf 10^6 Zellen/mL eingestellt und in jedes Well 40 μ L der Zellsuspension gegeben. Danach erfolgte die Zugabe von 10 μ L Lysepuffer und die 96-well Platte wurde für zehn Minuten geschüttelt. Daneben wurde in separate Wells 50 μ L des Lysepuffers als negative Kontrolle und 50 μ L des mitgelieferten lyophilisierten p53 Zelllysats als positive Kontrolle pipettiert. Nun wurde in alle Wells die Antikörperlösung gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Überschüssige Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Nach Zugabe und 30-minütiger Inkubation von 100 μ L der Detektions-Lösung wurde die Reaktion mit der Stopp-Lösung beendet und die Platte bei 450 nm im Mikrotiterplattenlesegerät Wallac Victor³ photometrisch ausgewertet.

2.2.3.7 Caspase-3,-8 und -9 Nachweis

Wie schon in Abschnitt 1.1.2 erwähnt spielen die Enzyme vom Caspase-Typ eine wichtige Rolle bei der Apoptose. Die Caspase-8 steht für den extrinsischen Weg und Caspase-9 für den intrinsischen Weg der Kaskade. Die Caspase-3 ist das Schlüsselenzym und stellt ein entscheidendes Signal bei der Aktivierung der Apoptose dar.

Die Aktivitätsmessung der Caspase-3 erfolgte mittels des CaspGLOW Fluorescein Active Caspase-3 Staining Kits. Nach der Exposition wurden die Zellen 2-mal mit HBSS gewaschen und in der Neubauerkammer ausgezählt. Die Zellzahl wurde auf 10^6 Zellen/mL eingestellt und 300 μ L der Zellsuspension jeweils mit 1,0 μ L FITC-DEVD-FMK in DMEM für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Dieses mit Fluorescein gekoppelte Reagenz ist ein spezifischer Inhibitor der Caspase-3 und bindet irreversibel an das aktive Enzym. Die markierten Zellen wurden anschließend zweimal mit Puffer gewaschen und die Fluoreszenz anhand der Durchflusszytometrie am FACSCalibur bestimmt.

Das Vorgehen für Caspase-8 und -9 war identisch. Der verwendete Inhibitor für Caspase-8 ist FITC-IETD-FMK und für Caspase-9 FITC-LEHD-FMK.

2.2.3.8 JC-1 Test

Um eine Aussage über das Membranpotential von Mitochondrien zu treffen, wurde der kationische lipophile Farbstoff JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid) verwendet. Bei intaktem Membranpotential diffundiert dieser in die Mitochondrien und liegt dort als J-Aggregat vor. Erfolgt die Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm, emittieren die Aggregate rotes Licht der Wellenlänge 590 nm (siehe Abbildung 2-5). Bei einer Depolarisation der Mitochondrienmembran sind die Aggregate nicht stabil und zerfallen in Monomere, die aus dem Organellinneren zurück ins Zytosol diffundieren. Somit nimmt die rote Fluoreszenz ab und die JC-1 Monomere emittieren grünes Licht der Wellenlänge 530 nm.

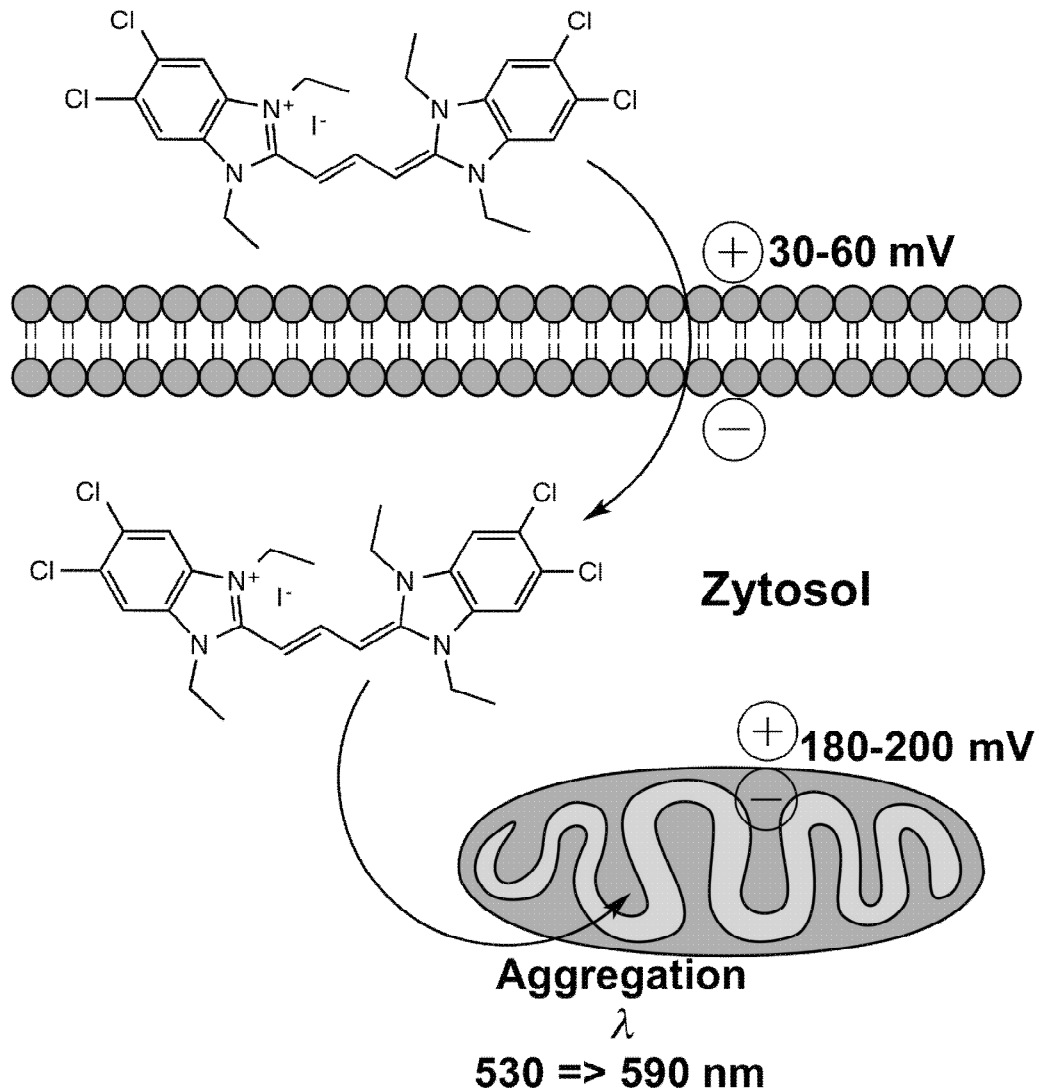


Abb. 2-5: Fluoreszenzänderung des Farbstoffs JC-1: Bei intaktem mitochondrialen Membranpotential bildet der JC-1 Farbstoff ein farbiges Aggregat und emittiert Licht der Wellenlänge 590 nm.

Nach Ozonexposition wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und die Zellzahl auf 10^6 Zellen/mL eingestellt. Die Zellsuspension wurde mit 2,5 μ L JC-1 Farbstoff versetzt und 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschritte mit HBSS und die Messung der Fluoreszenz im Durchflusszytometer FACSCalibur. Die Detektion der roten Fluoreszenz geschah im Fluoreszenzkanal FL 2 und die der grünen Fluoreszenz in FL 1.

2.2.3.9 Total Reactive Oxygen Species (ROS) Assay Kit

Die Bildung von ROS nach Ozonbehandlung wurde mit Hilfe des ROS-Assay Kits untersucht. Dazu wurde die Zellzahl der Proben nach Ozonexposition auf ca. 10^6 Zellen/mL eingestellt und anschließend für drei Stunden mit 100 μ L der Assay Stain Solution in HBSS im Brutschrank inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte am Durchflusszytometer FACSCalibur.

2.2.3.10 Bcl-2 Assay

Der Nachweis von antiapoptotischen Signalen geschah durch den Bcl-2 Platinum ELISA. Dafür wurden die Zellen nach Exposition lysiert und die Bcl-2-Konzentration nach dem Herstellerprotokoll im Mikrotiterplattenlesegerät Wallac Victor³ photometrisch bei 450 nm ermittelt.

2.2.3.11 CFU Assay

Der Colony Forming Unit Assay (CFU-Assay) gibt Auskunft über die Proliferationsaktivität von Zellen. Dafür wurden die Zellen nach Versuchsende gezählt und 500 Einzelzellen in einer 6-well Platte ausgesät. Die Zellen wurden mit 2 mL DMEM + 10% FCS bedeckt und wuchsen sieben Tage im Brutschrank. Anschließend wurde das Zellmedium abgesaugt und 1 mL 10% Dimethylmethylenblau-Lösung zum Anfärben der Kolonien zugegeben.

2.2.4 Digitale holografische Mikroskopie

Bei der digitalen holografischen Mikroskopie gelangt Licht von einem Laserstrahl auf ein Objekt und interferiert mit einem Referenz Laserstrahl. Das entstehende Bild kann digital in 3-D rekonstruiert werden. Dabei wird von dem durch eine Probe transmittiertem Licht sowohl die Amplitude als auch die Phase aufgenommen. Die Phase gibt Auskunft über die optische Dichte des Objekts und gibt an, wie viel Licht vom Objekt „abgebremst“ wurde [Alm, 2013].

Die Technologie des HoloMonitor M3 basiert auf digitaler holographischer Mikroskopie. Zur Analyse der Zellen ist kein Anfärben nötig und die 3D-Holographie und Phasenkontrastaufnahmen können direkt im Standardzellkulturgefäß stattfinden. Bei der digitalen Holografie werden die gebeugten Felder rechnerisch am Computer rekonstruiert.

Nach Ozonexposition wurden die Zellen direkt in der Zellkulturflasche im Mikroskop betrachtet.

2.2.5 Verwendete Software und Statistik

2.2.5.1 Auswertung Durchflusszytometrie

Das Programm FlowJo Ver. 8.8.7 der Fa. FlowJo, Ashland, USA, diente zur Auswertung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie.

Die Versuche zur Caspase wurden mittels einem Histogramm ausgewertet. Anhand von Kontrollzellen wurde ein Gate gelegt in dem 10% der Zellen Caspase positiv waren. Zellen innerhalb des Gates wurden als Caspase-positiv, Zellen außerhalb des Gates als Caspase-negativ definiert (siehe Abschnitt 3.3.2 und 3.3.5).

Bei den ROS Versuchen wurde zunächst ein Histogramm erstellt und anhand der Negativkontrolle die x-Achse in einen positiv und einen negativ Bereich geteilt (siehe Abschnitt 3.3.4).

Die Auswertung des JC-1 Tests erfolgte anhand eines Histogramms des FL 2 Kanals. Dafür wurde mittels Kontrollversuchen ein Gate gelegt, in welchem 10% der Zellen ein kollabiertes Membranpotential aufwiesen (siehe Abschnitt 3.3.4).

2.2.5.2 Statistische Methoden

Die Auswertung der erzielten Ergebnisse erfolgte mittels der Software Prism Ver. 6.0 für Mac OS X der Fa. GraphPad, La Jolla, USA.

Material und Methoden

Bei den verschiedenen Versuchen wurden aus der entsprechenden Versuchsanzahl jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet. Die genauen Zahlenwerte sind im Anhang wiederzufinden. Für paarweise Vergleiche zweier Mittelwerte bei kontinuierlicher Verteilung wurde der t-Test für ungepaarte Stichproben angewendet. Als Signifikanzgrenze für die Irrtumswahrscheinlichkeit galt $p \leq 0,05$. Zur üblichen Kennzeichnung von signifikanten und hochsignifikanten Unterschieden wurde folgende Symbolik verwendet [Sachs, 1991]:

- * $0,05 \geq p > 0,01$
- ** $0,01 \geq p > 0,001$
- *** $0,001 \geq p$

3. Ergebnisse

3.1 in-situ Dosimetrie

Pilotversuche mit der Expositionsapparatur hatten deutlich werden lassen, dass die am Ozongenerator über die UV Absorption bei 254nm eingestellten Konzentrationen bereits nach kurzem Transportweg abgefallen waren – möglicherweise in Umkehrung der im Abschnitt 1.1.1 vorgestellten Reaktionsgleichungen /1/ und /2/. Vor diesem Hintergrund war eine Dosimetrie "in situ" notwendig.

3.1.1 Berechnung der Ozonlöslichkeit

Das Henry-Gesetz beschreibt das Löslichkeitsverhalten von flüchtigen Substanzen in einer Flüssigkeit. In diesem Versuchsaufbau ist das die Löslichkeit von Ozon in HBSS. Die Korrelation der Henry-Konstante wurde von Roth und Sullivan (1981) beschrieben:

$$/1/ \quad H_{px} = 3,84 \times 10^7 [\text{OH}^-]^{0,035} \exp(-2428/T) \quad [\text{Roth, 1981}]$$

Zur Berechnung für die in diesem System gelöste Ozonkonzentration sind weitere Formeln nötig:

$$/2/ \quad \text{Stoffmengenanteil: } \chi = \frac{n(O_3)}{n(O_2) + n(O_3)}$$

$$/3/ \quad \text{Partialdruck} = 1\text{atm} * \chi$$

Die gelöste Ozonkonzentration ergibt sich durch Einsetzen von [1] und [3] in [4]:

Ergebnisse

/4/ $C_{\text{aq}}(\text{O}_3) = H_{\text{cp}} \cdot \text{Partialdruck}$

Die ausführliche Berechnung findet sich im Anhang III.1 wieder.

Die theoretisch berechneten Ergebnisse für die relevanten Ozonkonzentrationen finden sich in Tabelle 3-1 wieder.

Tabelle 3-1: Vergleich der Ozonkonzentrationen

$c(\text{O}_3)$ Ozonomat $[\%w/w]$	$c(\text{O}_3)$ Gasphase $[\frac{g(\text{O}_3)}{m^3(\text{O}_2)}]$	$c(\text{O}_3)$ Gasphase $[ppm]$	$c(\text{O}_3)$ gelöst $[\frac{g(\text{O}_3)}{m^3(\text{H}_2\text{O})}]$
0,03	0,43	200	0,06
0,1	1,43	668	0,2
0,2	2,86	1336	0,4
0,3	4,29	2000	0,6
0,5	7,15	3340	1,0

Um nun Indigokarmin zur Abschätzung der tatsächlich gelösten Ozonkonzentration verwenden zu können, ist von einer 1:1 Reaktion von Indigokarmin mit Ozon auszugehen. Dabei entstehen, wie in Abschnitt 2.2.3.1 gezeigt, aus einem Molekül Indigokarmin zwei Moleküle Isatin.

Bei einer am Ozonomat eingestellten Ozonkonzentration von 0,1% w/w und einem Gasfluss von ca. 200 ml/min gehen $0,2 \text{ g/m}^3 = 4,3 \text{ nmol/mL}$ Ozon in Lösung. In dem vorliegenden Versuchsaufbau sind pro Flasche 4ml Puffer vorhanden, in denen somit 17,4 nmol Ozon in Lösung gehen. Nimmt man eine konstante Flussrate von 200 ml/min an, gehen pro Minute 0,063 μmol Ozon von der Gasphase (55 mL) in die Flüssigphase (4 mL) über. Bei einer theoretischen Konzentration von Indigokarmin von 0,2 mM = 0,8 $\mu\text{mol/4ml}$ liegt eine Stoffmenge von 0,8 μmol vor. Die gelöste

Ergebnisse

Stoffmenge von Ozon beträgt 0,087 μmol pro Minute. Der Extinktionskoeffizient für das in diesen Versuchen verwendete Indigokarmin wurde anhand der Stammlösung ermittelt und betrug $E \approx 14000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Tabelle 3-2: Theoretische Absorption

Zeit in Minuten	Stoffmenge Indigokarmin nach Reaktion mit Ozon	Absorption theoretisch: $A = E \cdot c \cdot d$
0	0,8 μmol	2,80
1	(0,8-0,063) μmol =0,737 μmol	2,58
2	(0,8-0,126) μmol =0,674 μmol	2,36
3	(0,8-0,189) μmol =0,611 μmol	2,14
5	(0,8-0,315) μmol =0,485 μmol	1,70
10	(0,8-0,63) μmol =0,17 μmol	0,60

3.1.2 Übereinstimmung von theoretischer und gemessener Dosimetrie

Um die theoretisch erzielten Ergebnisse zu überprüfen wurde eine 0,2 mM Indigokarminlösung in HBSS hergestellt. Von dieser wurden jeweils wie im Zellversuch 4 mL in eine Zellkulturflasche überführt und mit Ozon bei einer Flussrate von 20 mL/min begast. Nach 0, 2, 3, 5 und 10 Minuten wurde die Lösung photometrisch bei 610 nm vermessen (siehe Tab. 3-3). Die Farbreaktion dazu ist in Abbildung 3-1 zu sehen.

Ergebnisse

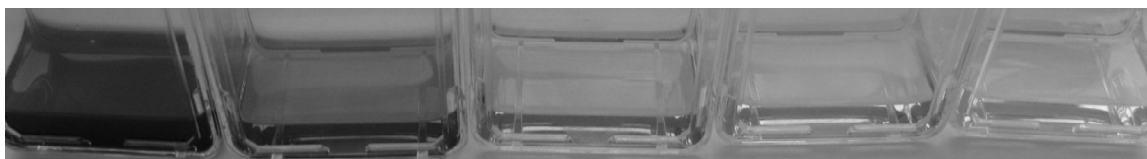


Abb. 3-1: Farbreaktion von Indigokarmin mit Ozon: Farbwechsel der blau gefärbten Indigokarminlösung zur gelb gefärbten Isatinlösung durch Reaktion mit Ozon (0,100% w/w).

Der Vergleich von theoretischer und gemessener Löslichkeit von Ozon ist in Tabelle 3-3 zu sehen. Dabei wurde jeweils die vermessene Extinktion von Indigokarmin nach unterschiedlicher Reaktionszeit mit Ozon mit den theoretischen Werten verglichen. Aufgrund der Tatsache, dass zum Zeitpunkt 0 Minuten noch kein Ozon gelöst war, wurde hierfür der Extinktionswert der unbehandelten Ausgangslösung gewählt.

Tabelle 3-3: Vergleich von berechneter und gemessener Löslichkeit

Zeit in [min]	Extinktion bei 610nm Mittelwert (n=5) ± Standardabweichung	Theoretischer Wert	Abweichung des ge- messenen Mittelwertes vom theoretischen [%]
0	2,76 ± 0,17	2,80	-1,4
1	2,62 ± 0,05	2,58	+1,6
2	2,44 ± 0,06	2,36	+3,4
3	1,91 ± 0,09	2,14	-10,7
5	1,40 ± 0,04	1,70	-17,6
10	0,37 ± 0,11	0,60	-38,3

3.2 Morphologie nach Ozonexposition

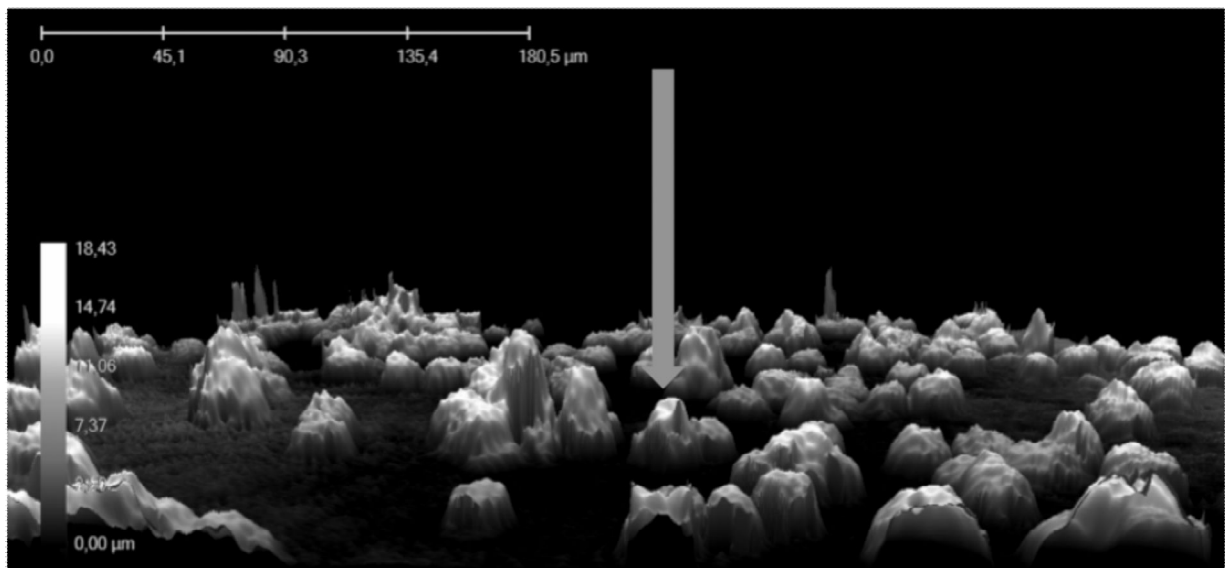
Der Schaden, den Zellen bei einer Ozon-Exposition erleiden, könnte mit der exponierten Oberfläche korrelieren. In Vorversuchen gab es Hinweise auf ein "blebbing", die sogenannte Blasenbildung auf der Zelloberfläche. Unklar war, ob es dabei um ein Artefakt handelte und ob dies auch im suspendierten Modell auftritt. Zur Klärung wurden die Zellen mit Ozon behandelt und direkt im Anschluss mit einem holografischen Mikroskop untersucht (siehe Abschnitt 2.2.4). Durch das Interferenzmuster zweier Laserstrahle ermittelt der sog. HoloMonitor M3 rechnerisch das Bild der Zelle und stellt es in drei Dimensionen am Computer dar. Eine Falschfarbenskala gibt die Höhe der Zelle [μm] über dem Boden der Zellkulturflasche an. Je heller die Zelle im Holomonitor erscheint, umso mehr ragt diese in die Höhe. Je dunkler die Zelle erscheint, umso abgeflachter ist diese. Der Durchmesser der Zellen lässt sich durch die Breitenskala [μm] abschätzen.

3.2.1 Morphologie im suspendierten Modell

Vor Versuchsbeginn wurden beide Zelllinien von der Zellkulturflasche abgelöst und in HBSS suspendiert. Ständiges Schaukeln der Apparatur hielt die Kontroll- und Ozon-exponierten Zellen in Suspension. Nach Behandlung mit 0,2% w/w Ozon für eine Stunde waren morphologische Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollzellen zu sehen, welche in den Abbildungen 3-2 und 3-3 gezeigt sind.

Ergebnisse

A549 Kontrolle



A549 Probe

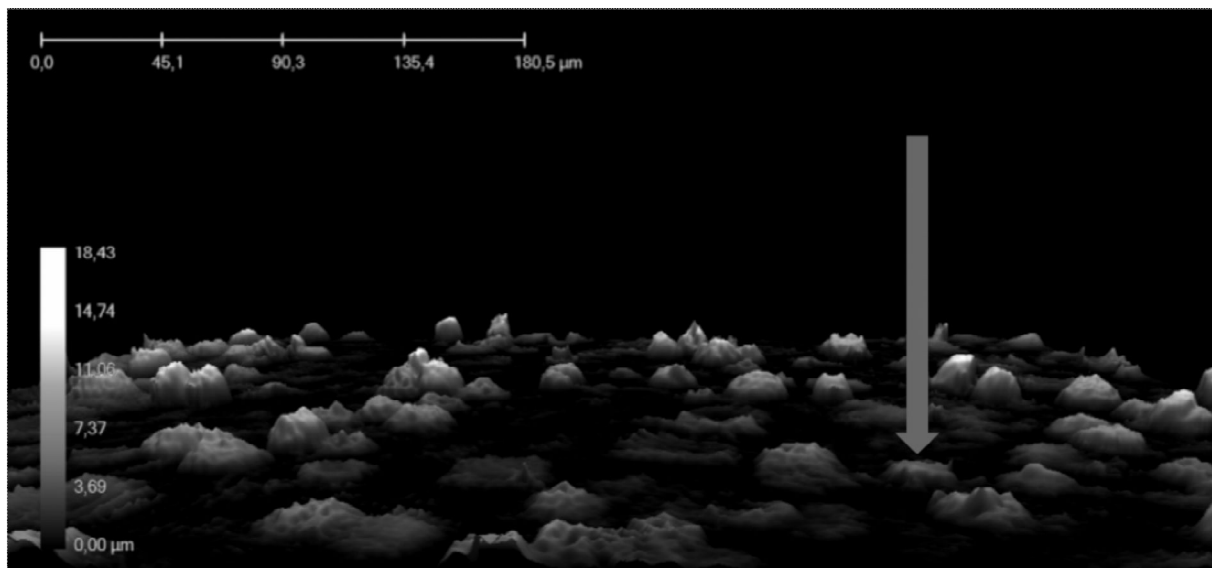
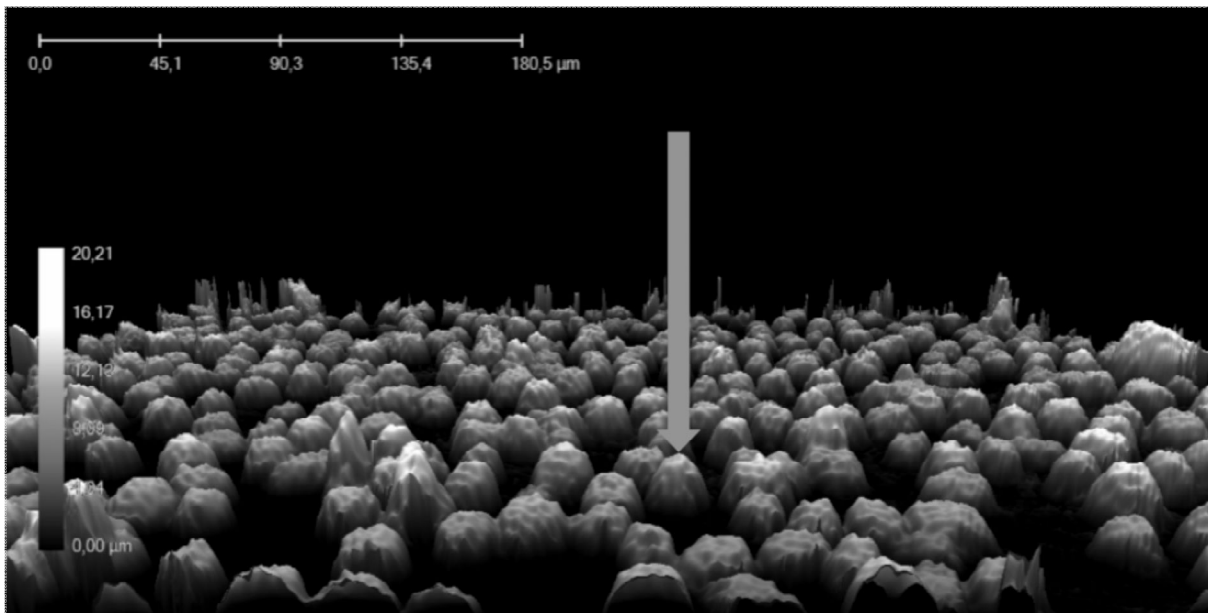


Abb. 3-2: Holografische Aufnahme von suspendierten Kontroll- und Ozon-exponierten A549 Zellen: Die Kontrollzellen wurden für 1 h in HBSS in Suspension gehalten. Die Ozon-exponierten Zellen wurden 1 h in HBSS mit Ozon (0,2% w/w) behandelt. Grüner Pfeil = kugelig Zellkörper; roter Pfeil = abgeflachter Zellkörper.

Ergebnisse

L929 Kontrolle



L929 Probe

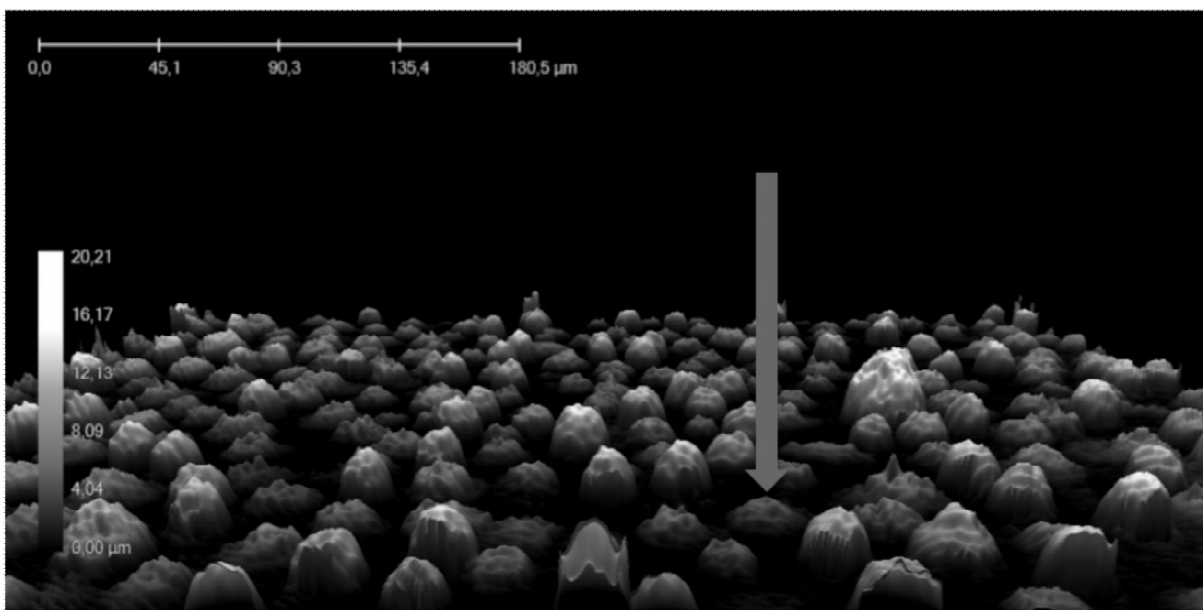


Abb. 3-3: Holografische Aufnahme von suspendierten Kontroll- und Ozon-exponierten L929 Zellen: Die Kontrollzellen wurden für eine 1 h in HBSS in Suspension gehalten. Die Ozon-exponierten Zellen wurden 1 h in HBSS mit Ozon (0,2% w/w) behandelt. Grüner Pfeil = kugeligter Zellkörper; roter Pfeil = abgeflachter Zellkörper.

Ergebnisse

Auf den Bildern ist bei keiner der beiden Zelllinien nach der Exposition eine Blasenbildung zu erkennen. Da beide Zelllinien in Suspension und noch nicht an der Oberfläche der Kulturflasche angewachsen waren sind kugelige Zellkörper zu sehen, die noch keine Ausbildung von Lamellipodia (Zellfortsätzen) zeigen. Jedoch ist aufgrund der 3D-Darstellung deutlich erkennbar, dass die Kontrollzellen einen kugeligen Zellkörper besitzen und in die Höhe ragen (siehe Abbildung 3-2 und 3-3, grüner Pfeil), wohingegen die ozonierten Zellen größtenteils abgeflachte erscheinen (siehe Abbildung 3-2 und 3-3, roter Pfeil).

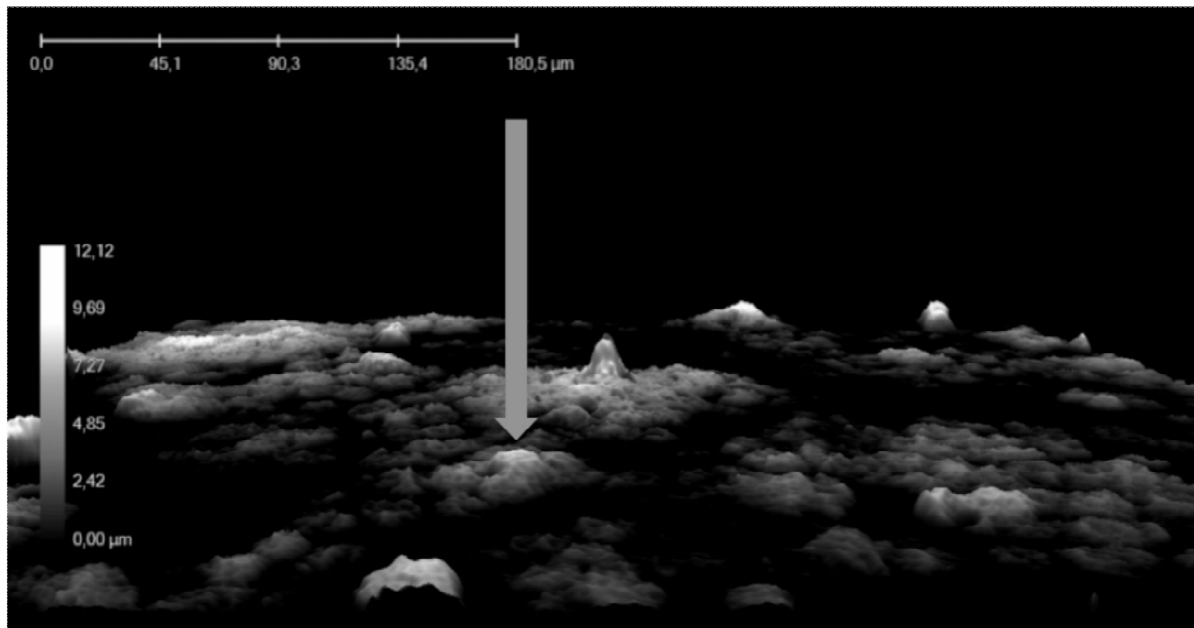
Auch im Lichtmikroskop war kein "blebbing" ersichtlich (ohne Abb).

3.2.2 Morphologie im adhärennten Modell

Beide Zelllinien wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn in Standard-Zellkulturflaschen ausgesät, um zu Versuchsbeginn einen adhärennten Zellrasen zu bilden. Anschließend wurden A549- und L929-Zellen eine Stunde bei 0,2% w/w Ozon exponiert. Die Abbildungen 3-4 und 3-5 zeigen die aufgetretenen morphologischen Veränderungen. Da die Zellen hier bereits angewachsen waren, zeigte sich bei den Kontrollen und Proben von vornherein ein stärker abgeflachter Zellkörper als im Vergleich zum Suspensionsmodell.

Ergebnisse

A549 Kontrolle



A549 Probe

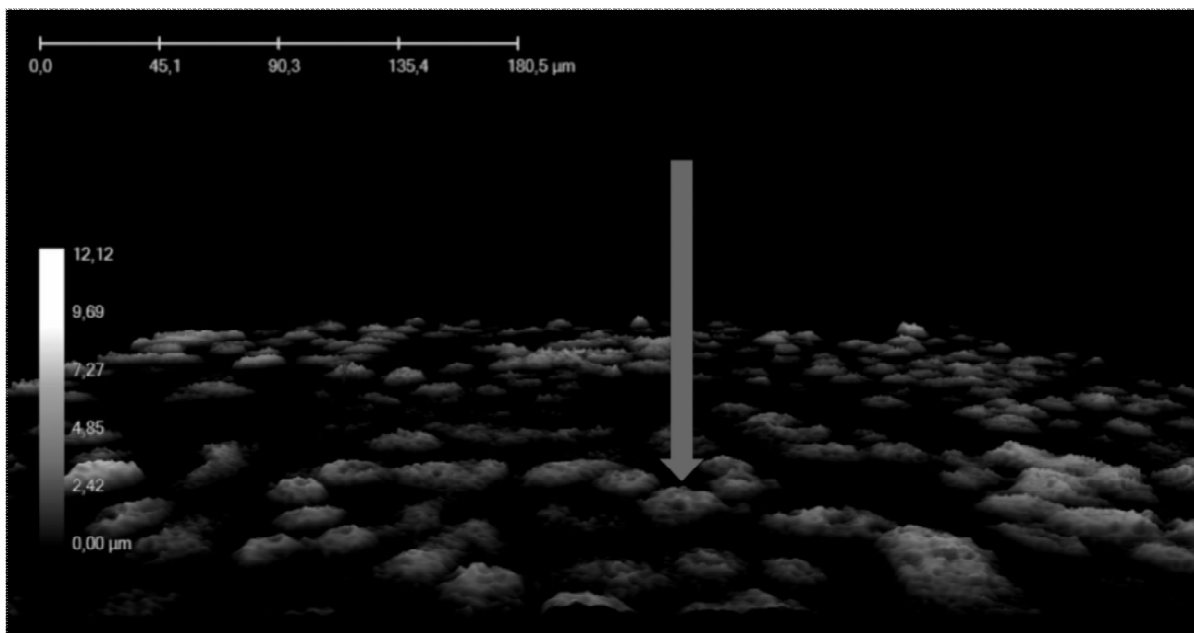
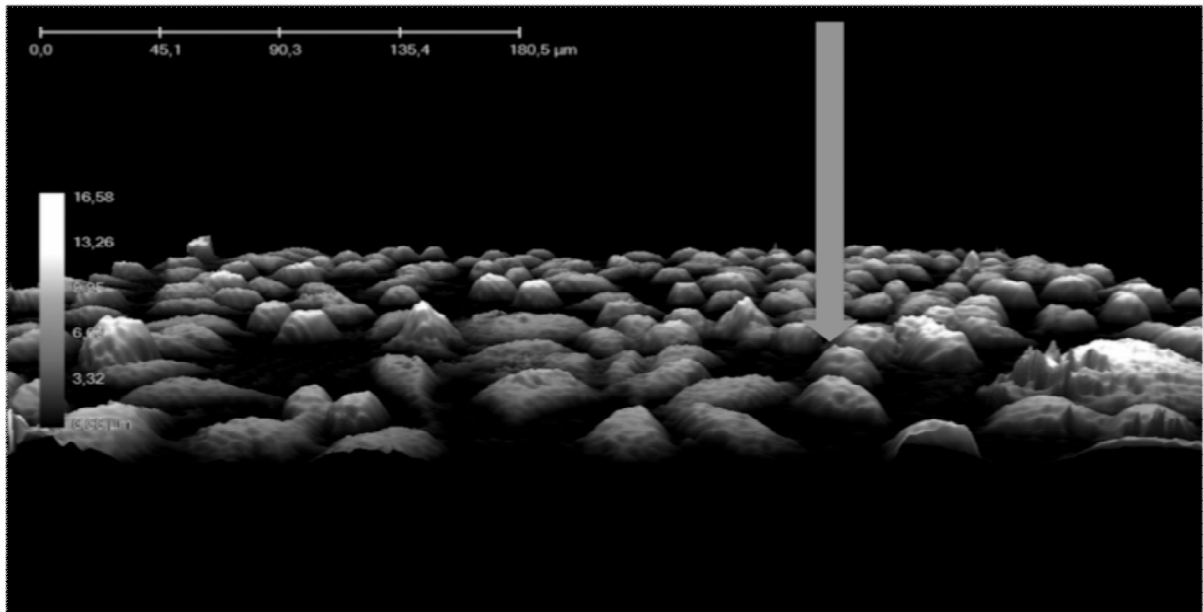


Abb. 3-4: Holografische Aufnahme von adhärennten Kontroll- und Ozon-exponierten A549 Zellen. Die Kontrollzellen wurden für 1 h in HBSS gehalten. Die Ozon-exponierten Zellen wurden in HBSS 1 h mit Ozon (0,2% w/w) behandelt. Grüner Pfeil = erhöhter Zellkörper; roter Pfeil = abgeflachter Zellkörper.

Ergebnisse

L929 Kontrolle



L929 Probe

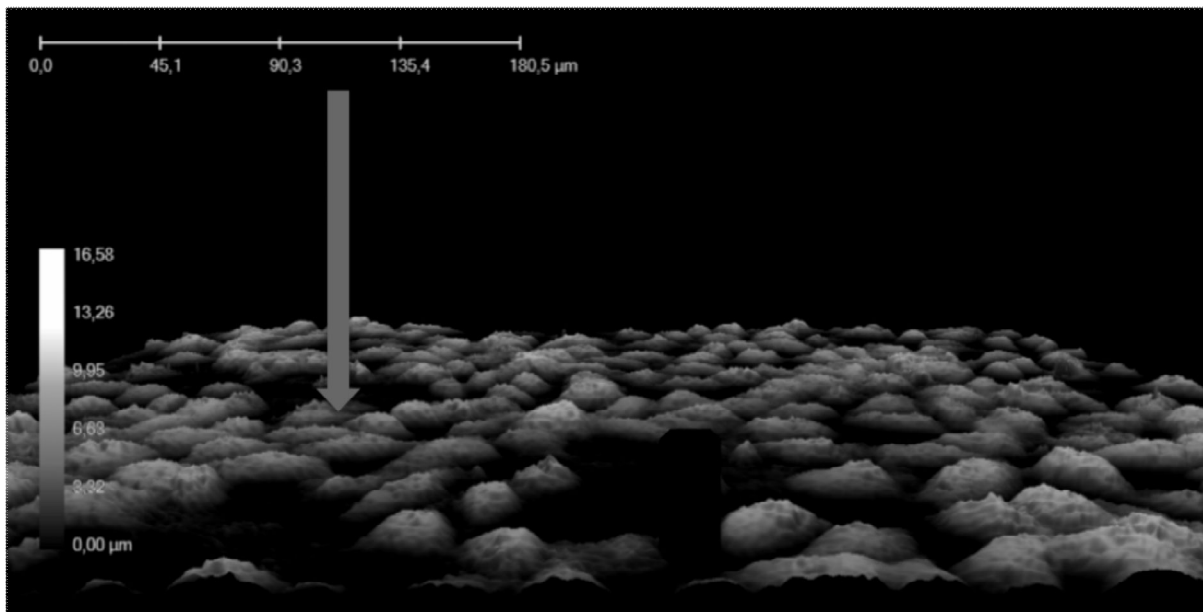


Abb. 3-5: Holografische Aufnahme von adhärenen Kontroll- und Ozon-exponierten L929 Zellen. Die Kontrollzellen wurden für 1 h in HBSS gehalten. Die Ozon-exponierten Zellen wurden in HBSS 1 h mit Ozon (0,2% w/w) behandelt. Grüner Pfeil = erhöhter Zellkörper; roter Pfeil = runder, abgeflachter Zellkörper.

Ergebnisse

Auch im adhärenenten Zellmodell war keine Blasenbildung zu erkennen. Hier konnte jedoch eine Verringerung der Ausbildung von Lamellipodia (Zellfortsätzen) beobachtet werden. Dies ist vor allem bei den L929 Zellen zu sehen. Es änderte sich nach Ozon-Exposition die erhöhte Zellform (siehe grüner Pfeil in Abbildung 3-5) mit fibroblasten-typischen Fortsätzen in eine runde, abgeflachte Form ohne Fortsätze (siehe roter Pfeil in Abbildung 3-5) und ohne Blasenbildung ("blebbing").

Auch im Lichtmikroskop war kein "blebbing" ersichtlich (Bilder nicht gezeigt).

3.3 In-vitro-Toxizität nach Ozonexposition

3.3.1 Dosis- Wirkungskurven anhand Membran- und metabolischer Toxizität

Zur Feststellung der Giftigkeit von Ozon in der verwendeten Expositionsapparatur wurden anhand verschiedener Parameter Konzentrations-Wirkungskurven ermittelt. Für beide Zelllinien erfolgte eine Behandlung mit Ozonkonzentrationen von 0 – 0,7% w/w Ozon für eine Stunde. Anschließend wurden die Zellsuspensionen von Kontrolle und Probe in drei Teile geteilt und zum einen die Membrantoxizität von Ozon mittels des Trypanblau-Assay (Abschnitt 2.2.3.2) und zum anderen die metabolische Toxizität mittels des Tietze-Assays (GSX) (Abschnitt 2.2.3.4) und des XTT-Assays (Abschnitt 2.2.3.3) ermittelt. Das Ergebnis für die A549 Zellen ist in Abbildung 3-6, das für die L929 Zellen in Abbildung 3-7 dargestellt.

Ergebnisse

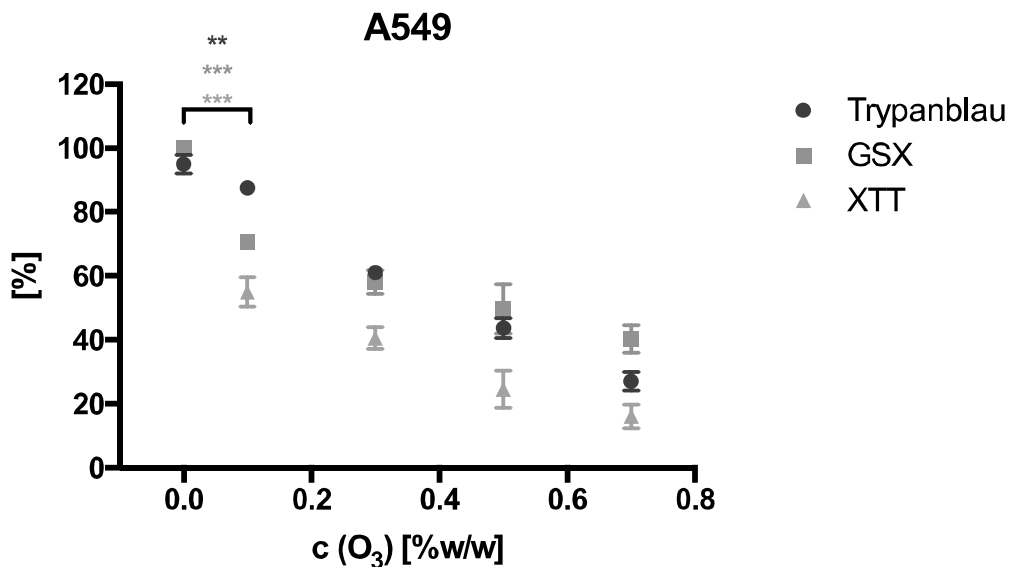


Abb. 3-6: Vergleich der Membran- und metabolischen Toxizität von A549 Zellen:

Der Trypanblau-Assay stellt den Prozentsatz ungefärbter zu gefärbten Zellen, der Tietze-Assay die Prozentzahl des Gesamtglutathions, bezogen auf die Kontrolle, und der XTT-Assay die Prozentzahl des gebildeten Formazans, bezogen auf die Kontrolle, dar. Zu sehen sind die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung bei Ozonkonzentrationen von 0 – 0,7% w/w. $p < 0,1$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) markieren die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle.

Wie aus Abbildung 3-6 ersichtlich zeigt sich bei der Reaktionskinetik eine Abnahme aller drei Parameter in der Form einer Hyperbel. Der Wert für die effektive Konzentration, bei dem 50% der Zellen eine Reaktion zeigen (EC₅₀), lag bei allen drei Parametern bei ca. 0,2% w/w Ozon. Am stärksten und schnellsten vom Ozonschaden betroffen war dabei die reduzierte Formazanbildung als Ausdruck einer metabolischen Störung. Membranschäden, die durch eine Trypanblau-Aufnahme erkennbar wurden, fielen bei niedriger Ozon-Belastung zunächst nicht ins Gewicht, wichen aber bereits ab einer Konzentration von 0,1% w/w Ozon – ebenso wie der GSX-Gehalt der Zellen – signifikant vom Zustand der Kontrollen ab.

Ergebnisse

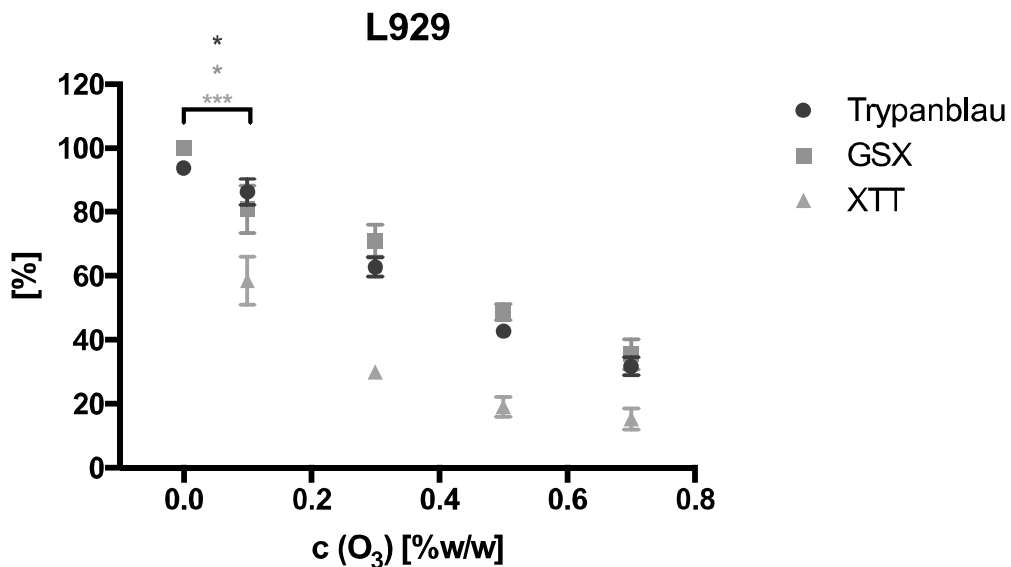


Abb. 3-7: Vergleich der Membran- und metabolischen Toxizität von L929 Zellen:

Der Trypanblau-Assay stellt den Prozentsatz ungefärbter zu gefärbten Zellen, der Tietze-Assay die Prozentzahl des Gesamtglutathions, bezogen auf die Kontrolle, und der XTT-Assay die Prozentzahl des gebildeten Formazans, bezogen auf die Kontrolle, dar. Zu sehen sind die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung bei Ozonkonzentrationen von 0 – 0,7% w/w. $p < 0,1$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) markieren die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle.

Im Vergleich zur humanen Zelllinie zeigten die L929-Zellen ein ähnliches Verhalten und eine exponentielle Abnahme der Formazanbildung. Die Abnahme der Trypanblau- und GSX-Werte verlief jedoch langsamer und entspricht einer Asymptote mit geradem Verlauf, wie Abbildung 3-7 zeigt. Auch der EC50-Wert für alle drei Parameter liegt dabei im Vergleich zu den A549 Zellen höher bei ca. 0,3% w/w Ozon.

3.3.2 Ozon induzierte Caspase-8 Aktivierung

Neben dem Trypanblau-Assay ist auch die Aktivierung der Caspase-8 ein Indikator für einen Membranschaden. Wie bereits in Abbildung 1-3 gezeigt, beginnt dieser Ozonschaden bei der Aktivierung sogenannter Zelltodrezeptoren und führt über die Aktivierung der Caspase-8 zum programmierten Zelltod. Hierfür wurden die Zellen eine Stunde bei 0,2% w/w Ozon begast und nach Aufarbeitung im Durchflusszytome-

Ergebnisse

ter vermessen. Abbildung 3-8 zeigt die Reproduzierbarkeit der Fluoreszenzmessung anhand von Kontrollversuchen.

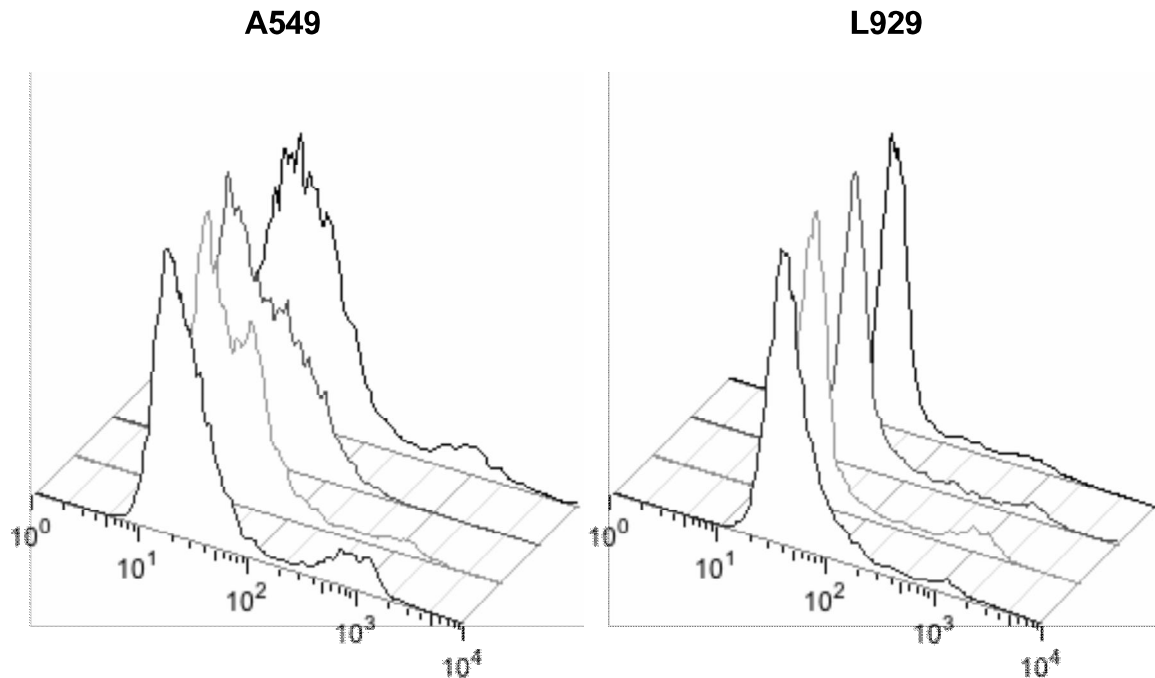


Abb. 3-8: Fluoreszenzmessung von Caspase-8: Die Grafik zeigt 4 unabhängige Versuche von A549 bzw. L929 Zellen nach Behandlung für 1 h mit Carbogen (Negativkontrolle). Für die Darstellung wurde hier ein Histogramm gewählt, das die Fluoreszenzintensität (x-Achse) gegen die Häufigkeit (y-Achse) aufträgt.

Anhand eines Kontrollversuchs wurde mit dem Programm FlowJo ein Gate um die Caspase-8 positive Population gelegt, in dem die Zellzahl $\approx 10\%$ war. Zellen innerhalb dieses Gates wurden als Caspase-8 positiv, Zellen außerhalb dieses Gates als Caspase-8 negativ definiert. Abbildung 3-9 zeigt die Verteilung der Messereignisse eines repräsentativen Versuchs.

Ergebnisse

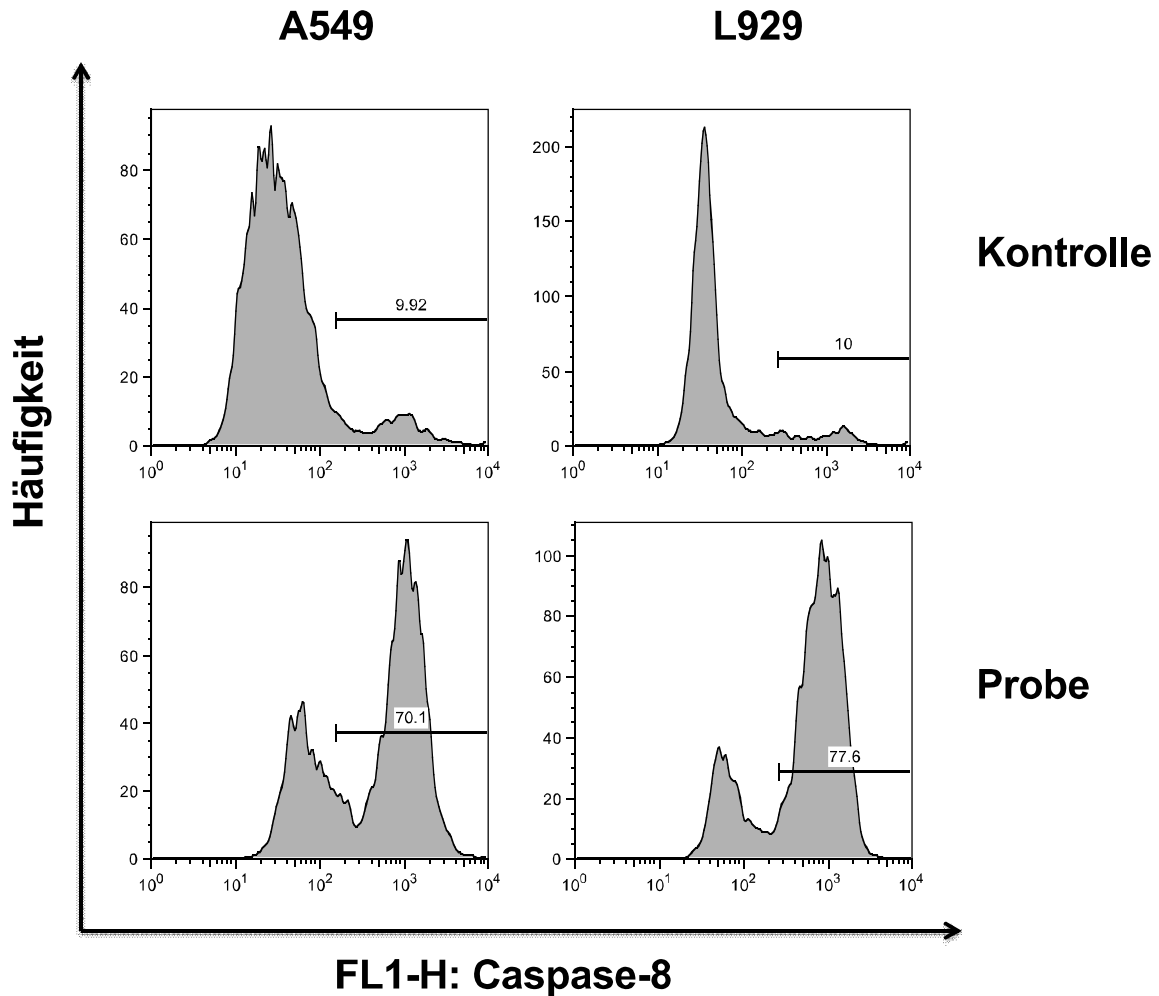


Abb. 3-9: Fluoreszenzmessung von Caspase-8: Die Grafik zeigt einen repräsentativen Versuch von A549 bzw. L929 Zellen nach Behandlung für 1 h mit Carbogen (Kontrolle) oder 1h mit 0,2% w/w Ozon (Probe). Für die Darstellung wurde hier ein Histogramm gewählt, das die Fluoreszenzintensität (x-Achse) gegen die Häufigkeit (y-Achse) aufträgt. Das "gate" wurde anhand der Kontrollen so gewählt, dass nicht mehr als 10% der Zellen Caspase-8 positiv waren.

Die Auswertung der Histogramme mehrerer Versuche liefert das in Abbildung 3-10 dargestellte Punktdiagramm.

Ergebnisse

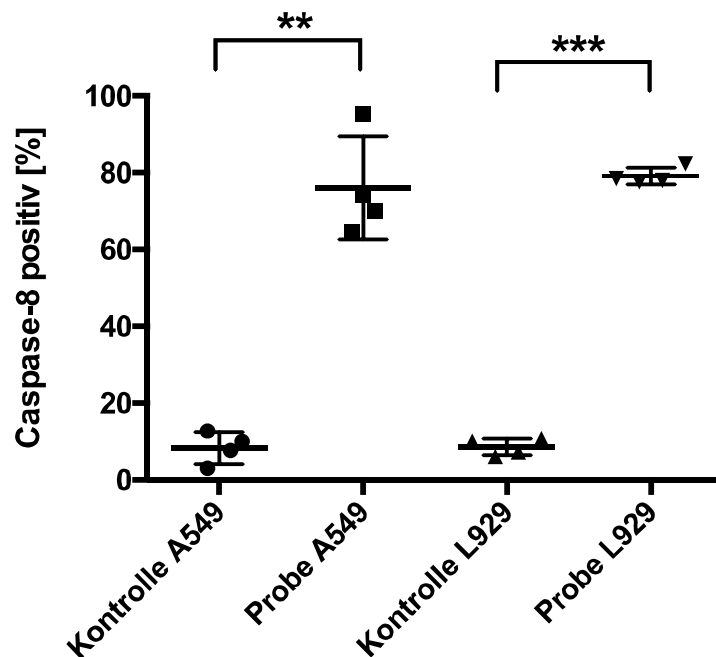


Abb. 3-10: Caspase-8 Aktivierung nach Ozonbehandlung: Exposition von A549 bzw. L929 Zellen für 1 h mit Carbogen (Kontrolle) oder 1 h mit 0,2% w/w Ozon (Probe). Dargestellt sind die Mittelwerte von Caspase-8 positiven Zellen [%] aus 4 unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung. $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) markieren die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle.

Beide Zelllinien zeigen hier im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikant erhöhte Caspase-8 Aktivität. Aufgrund dieser deutlichen Erhöhung kann von einer Aktivierung der sogenannten Todesrezeptoren an der Zellmembran durch Ozon ausgegangen werden. Im Gegensatz zum Trypanblau-Assay zeigt der Caspase-8 Nachweis eine erhöhte Sensitivität bei einer Ozonkonzentration von 0,2% w/w. Vergleicht man die Werte bei den A549 Zellen, so sind ca. 75% Caspase-8 positiv im Vergleich zu 30% Trypanblau-positiven Zellen (siehe Abbildung 3-6). Bei den L929 Zellen sind 80% Caspase-8 positiv im Vergleich zu 20% Trypanblau-positiven Zellen (siehe Abbildung 3-7).

3.3.3 Annexin V als frühapoptotisches Signal an der Zellmembran

Annexin V dient als Nachweis für ein frühapoptotisches Signal. Dabei werden zu Beginn der Apoptose von der Innenseite der zellulären Membran Phosphatidylserinköpfe nach außen geklappt. An diese Köpfe bindet Annexin V. Zusätzlich mussten die Zellen noch mit dem FVD Farbstoff angefärbt werden um eine Unterscheidung von vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen vorzunehmen. Weil Annexin V alleine bei den nekrotischen Zellen ein positives Signal geben würde, da es wegen der porösen Membran nekrotischer Zellen in das Zellinnere gelangt und dort bindet, wurde der Farbstoff FVD hinzugezogen, der nekrotische Zellen anfärbt. Jedoch war nach Aufarbeitung der Zellen nur ein positives FVD Signal und kein Annexin V Signal im Durchflusszytometer messbar (Daten nicht gezeigt). Ein fehlendes Signal deutet auf die in der Literatur beschriebene Aushärtung der Zellmembran hin [Pryor, 1995], so dass die Köpfe nicht in der Lage sind, von innen nach außen zu klappen.

3.3.4 ROS-Bildung und Einfluss auf das mitochondriale Membranpotential

Neben dem Ozonschaden an der Zellmembran ist auch ein intrazellulärer Schaden zum einen von Ozon direkt und durch die Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies denkbar. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst untersucht, ob ein erhöhtes Vorkommen von ROS nach Ozonbehandlung in den Zellen nachweisbar ist.

Anhand eines Kontrollversuchs wurde mit dem Programm FlowJo ein Gate um die ROS positive Population gelegt, in dem die Zellzahl $\approx 1\%$ war. Zellen innerhalb dieses Gates wurden als ROS positiv, Zellen außerhalb dieses Gates als ROS negativ definiert. Aufgrund der Tatsache, dass H_2O_2 auch zu einer erhöhten ROS Bildung führt, wurde H_2O_2 als Positivkontrolle gewählt. Abbildung 3-11 zeigt die Verteilung der Messereignisse eines repräsentativen Versuchs.

Ergebnisse

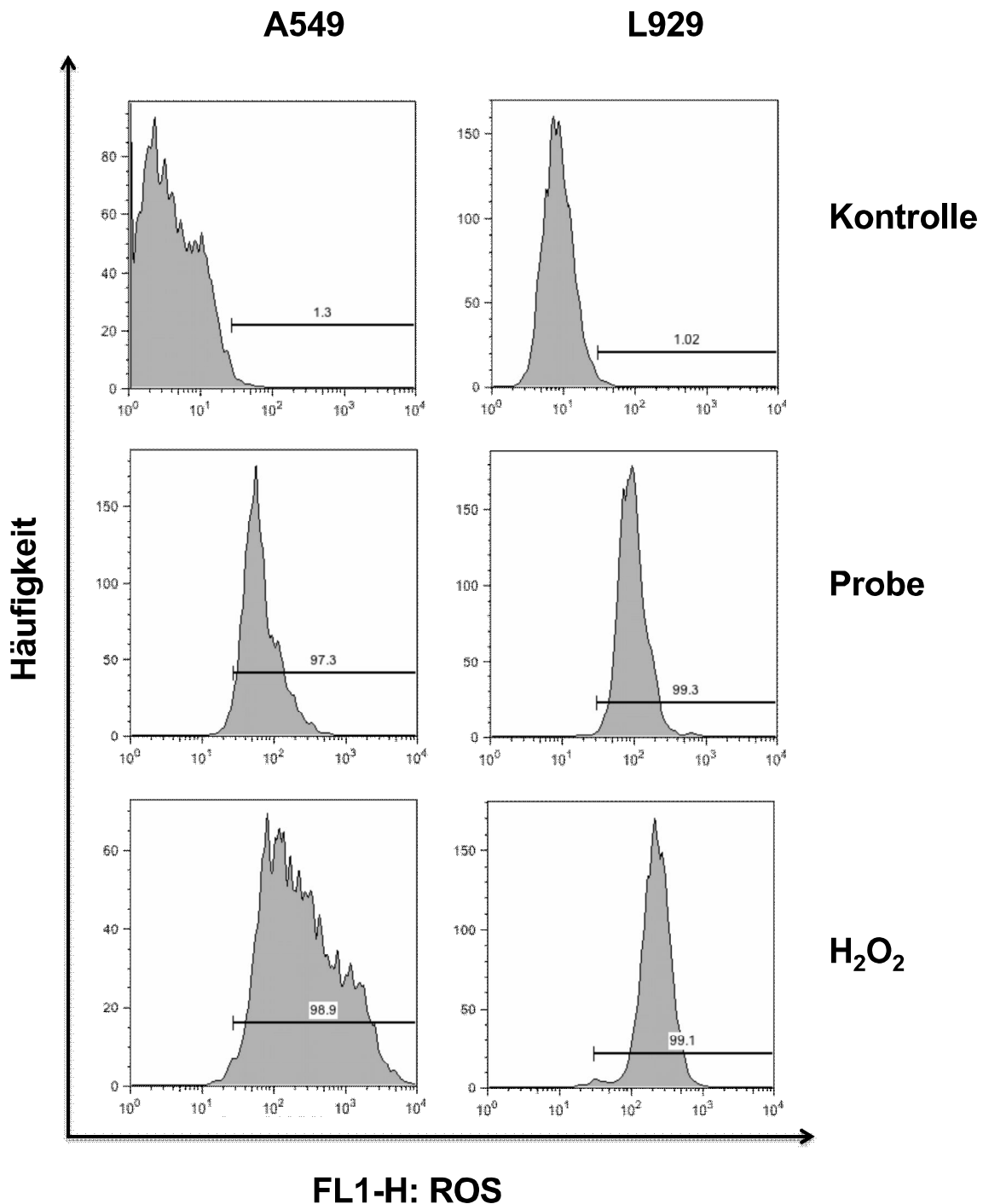


Abb. 3-11: Bildung von ROS nach Ozon- und H₂O₂-Exposition: Die Grafik zeigt eine repräsentative Aufnahme von A549 bzw. L929 Zellen nach Behandlung für 1 h mit Carbogen (Kontrolle) oder 1 h mit 0,2% w/w Ozon (Probe). 1 mM H₂O₂ wurden für 10 min zugegeben (Positivkontrolle). Für die Darstellung wurde hier ein Histogramm gewählt, das die Fluoreszenzintensität (x-Achse) gegen die Häufigkeit (y-Achse) aufträgt. Das "gate" wurde anhand der Kontrollen so gewählt, dass ca. 1% der Zellen ROS positiv waren.

Ergebnisse

Sowohl Ozon als auch H_2O_2 exponierte Zellen zeigten eine Zunahme der Fluoreszenzintensität, was eine erhöhte Bildung von ROS bedeutet. Die Auswertung der Histogramme lieferte folgende Zahlenwerte (Abbildung 3-12):

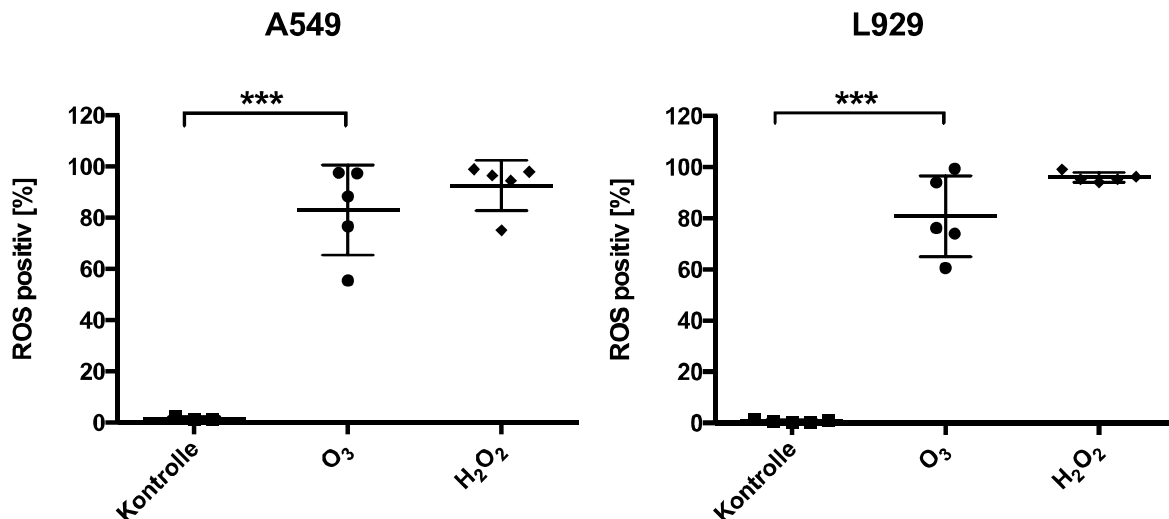


Abb. 3-12: Bildung von ROS nach Ozon- und H_2O_2 -Exposition: Exposition von A549 bzw. L929 Zellen für 1 h mit Carbogen (Kontrolle) oder 1 h mit 0,2% w/w Ozon (Probe). 1 mM H_2O_2 wurden für 10 min zugegeben (Positivkontrolle). Dargestellt sind die Mittelwerte von ROS positiven Zellen [%] aus 5 unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung. $p < 0,001$ (***) markieren die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle.

Beide Zelllinien zeigten eine signifikante Erhöhung der gebildeten ROS. Betrachtet man den Prozentanteil gebildeter ROS, kann dabei die gewählte Ozonkonzentration von 0,2% w/w für 1 h etwa einer Inkubation von 1 mM H_2O_2 für 10 min gleichgesetzt werden.

Der Farbstoff JC-1 konnte klären, welche Auswirkung ROS und Ozon auf das mitochondriale Membranpotential haben. Wie bereits in Abschnitt 2.2.3.8 erklärt bildet dieser bei intaktem Membranpotential ein farbiges Dimer, welches im Durchflusszytometer gemessen werden kann. Dafür wurden die Zellen für eine Stunde bei 0-0,2% w/w Ozon exponiert und mit dem Farbstoff behandelt. Anhand eines Kontrollversuchs wurde mit dem Programm FlowJo ein Gate festgelegt, in dem $\approx 10\%$ der Zellen keine Aggregate des JC-1 Farbstoff bildeten und somit das Membranpotential kollabiert war. Zellen außerhalb dieses Gates wiesen ein intaktes Membranpotential auf. H_2O_2

Ergebnisse

diente wieder als Positivkontrolle. Dargestellt ist der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials in Abbildung 3-13 in Form von Histogrammen. Die Auswertung dieser Histogramme liefert die in Abbildung 3-14 dargestellte Dosis-Wirkungs-Kurve.

Ergebnisse

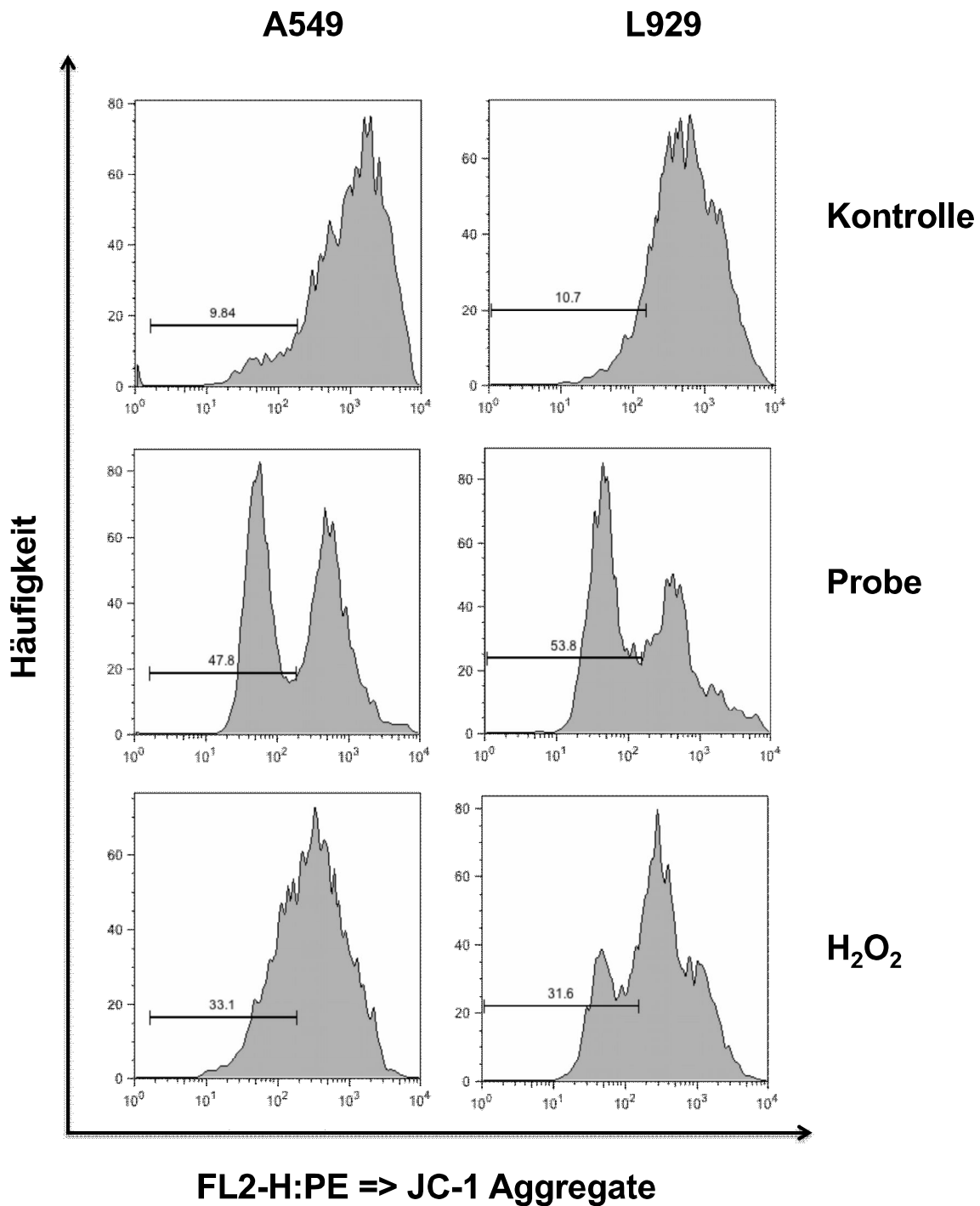


Abb. 3-13: Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials: Die Grafik zeigt eine repräsentative Aufnahme von A549 bzw. L929 Zellen nach Behandlung für 1 h mit Carbogen (Kontrolle) oder 1 h mit 0,2% w/w Ozon (Probe). 1 mM H₂O₂ wurden für 10 min zugegeben (Positivkontrolle). Für die Darstellung wurde hier ein Histogramm gewählt das die Fluoreszenzintensität (x-Achse) gegen die Häufigkeit (y-Achse) aufträgt. Das "gate" wurde anhand der Kontrollen so gewählt, dass ca. 10% des JC-1 Farbstoffs als Monomer in den Zellen vorlag.

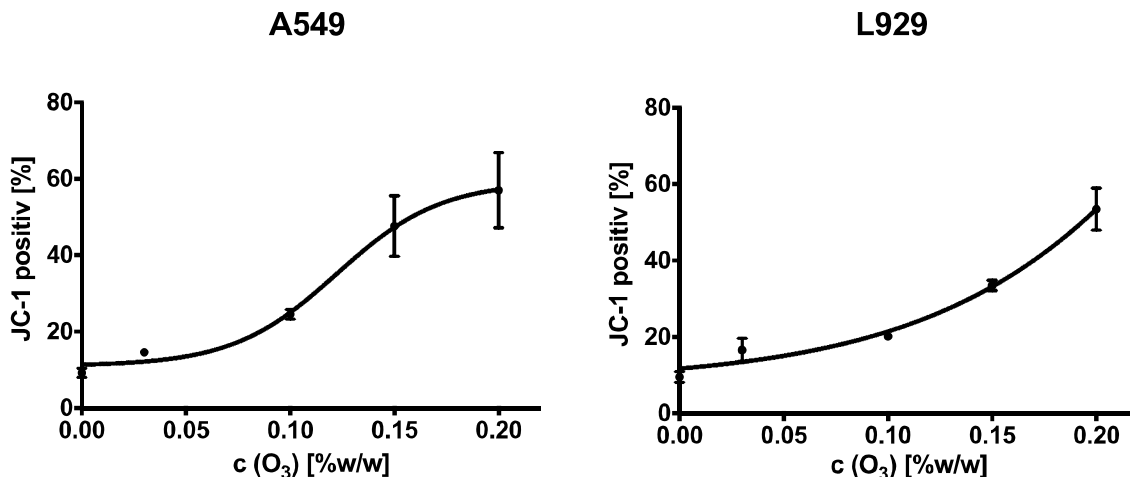


Abb. 3-14: Konzentrationsabhängiger Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials: Die Grafik zeigt A549 bzw. L929 Zellen nach Behandlung für 1 h mit 0,0-0,2% w/w Ozon. Dargestellt sind die Mittelwerte von JC-1 positiven Zellen [%] aus 3 unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung.

Beide Zelllinien zeigen ähnliche Konzentrations-Wirkungskurven und einen EC50-Wert, der bei ca. 0,15-0,2% w/w Ozon liegt. Bei 0,2% w/w Ozon ist bei fast 60% der Zellen das Membranpotential kollabiert. Somit liegt hier ein Zusammenhang in gleicher Höhe zwischen dem Zusammenbruch des Membranpotentials und der ROS Bildung vor.

3.3.5 DNA Schaden und Caspase-3 und -9 Aktivierung

Ozon aber auch ROS bewirken einen DNA-Schaden. Die Bestimmung des DNA-Schadens erfolgte mittels des Tumorsuppressorgens p53 (siehe Abschnitt 2.2.3.6). Die Zellen wurden dafür nach Ozonexposition laut dem Herstellerprotokoll aufgearbeitet und anschließend im Mikrotiterplattenlesegerät vermessen. Dabei wurde der p53-Gehalt nach 0, 4 und 24 Stunden bestimmt. H₂O₂ diente wiederum als Positivkontrolle. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-15 gezeigt.

Ergebnisse

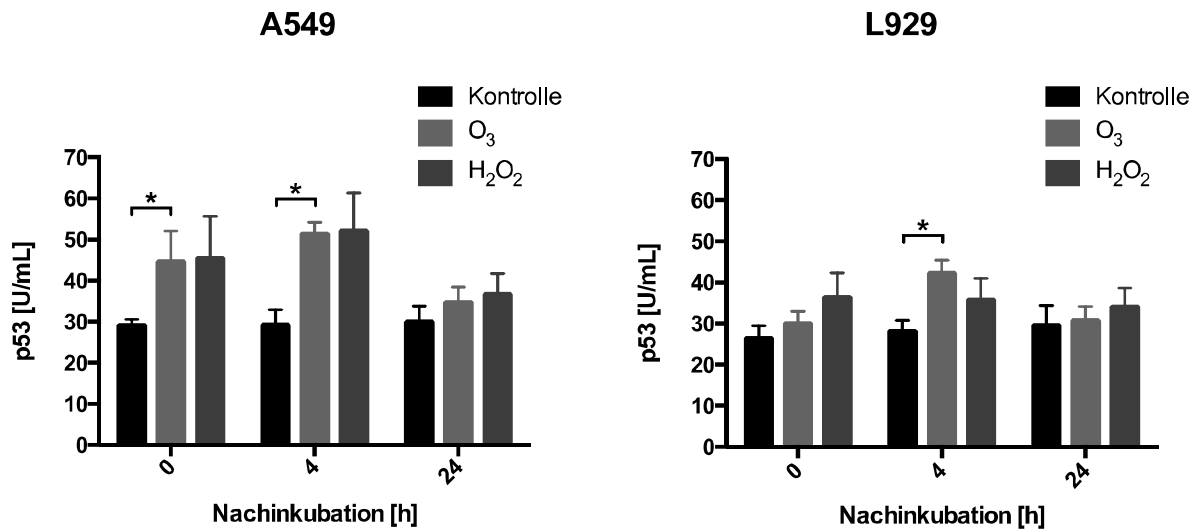


Abb. 3-15: Zeitlicher Verlauf der p53 Konzentration nach Ozonexposition: Die Grafik zeigt den zeitlichen Verlauf der p53 Konzentration [U/mL] in A549 bzw. L929 Zellen nach Behandlung für 1 h mit 0,0% w/w Ozon (Kontrolle), 0,2% w/w Ozon (Probe) und für 10 min mit 1 mM H₂O₂ (Positivkontrolle). Dargestellt sind die Mittelwerte der p53-Konzentration aus 4 unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung. $p < 0,1$ (*) markiert die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle.

Offensichtlich führten Ozon und ROS bei beiden Zelllinien zur Erhöhung der intrazellulären p53-Konzentration. Die p53-Konzentration stieg nach Ozonexposition im Vergleich zur Kontrolle an und hatte ihr Maximum nach 4 Stunden erreicht. Nach 24 Stunden war die p53-Konzentration auf den Ausgangswert gesunken. H₂O₂ zeigte dabei eine fast identische Zeitkinetik wie nach Ozonexposition. Die humane A549 Zelllinie zeigte einen stärkeren Anstieg im Vergleich zur murinen L929 Zelllinie.

Da es nach Ozonschaden zu einer Anhäufung von p53 kommt, konnte davon ausgegangen werden, dass p53 Gene der Bcl2-Familie aktiviert, die in Form einer Signalkaskade zunächst eine Ausschüttung von Cytochrom-c aus den Mitochondrien bewirkten. Die Folge war die Aktivierung der intrinsischen Caspase Kaskade.

Wie für Caspase-8 (siehe Abschnitt 3.3.2) wurde für Caspase-9 der gleiche Versuch durchgeführt, um dabei einen direkten Vergleich beider Initiatorcaspasen zu bekommen. Abbildung 3-16 zeigt die Reproduzierbarkeit der Fluoreszenzmessung anhand von Kontrollversuchen.

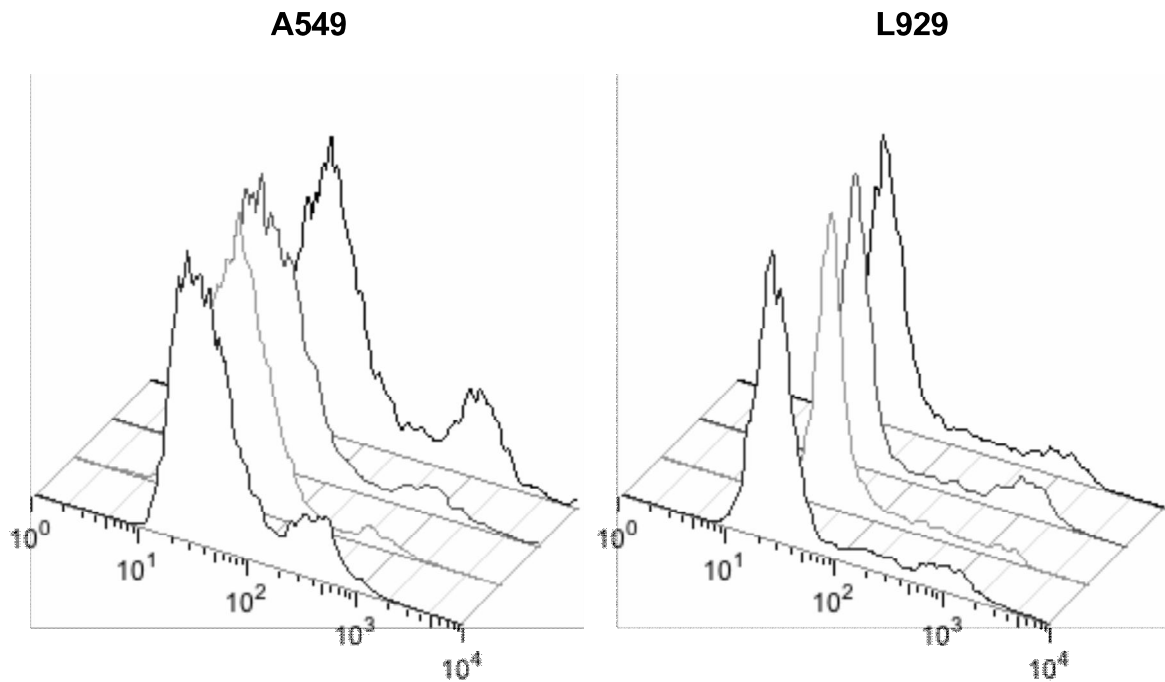


Abb. 3-16: Fluoreszenzmessung von Caspase-9: Die Grafik zeigt 4 unabhängige Versuche von A549 bzw. L929 Zellen nach Behandlung für 1 h mit Carbogen (Negativkontrolle). Für die Darstellung wurde hier ein Histogramm gewählt, das die Fluoreszenzintensität (x-Achse) gegen die Häufigkeit (y-Achse) aufträgt.

Anhand eines Kontrollversuchs wurde mit dem Programm FlowJo ein Gate um die Caspase-9 positive Population gelegt, in dem die Zellzahl $\approx 10\%$ war. Zellen innerhalb dieses Gates wurden als Caspase-9 positiv, Zellen außerhalb dieses Gates als Caspase-9 negativ definiert. Abbildung 3-17 zeigt die Verteilung der Messereignisse eines repräsentativen Versuchs.

Ergebnisse

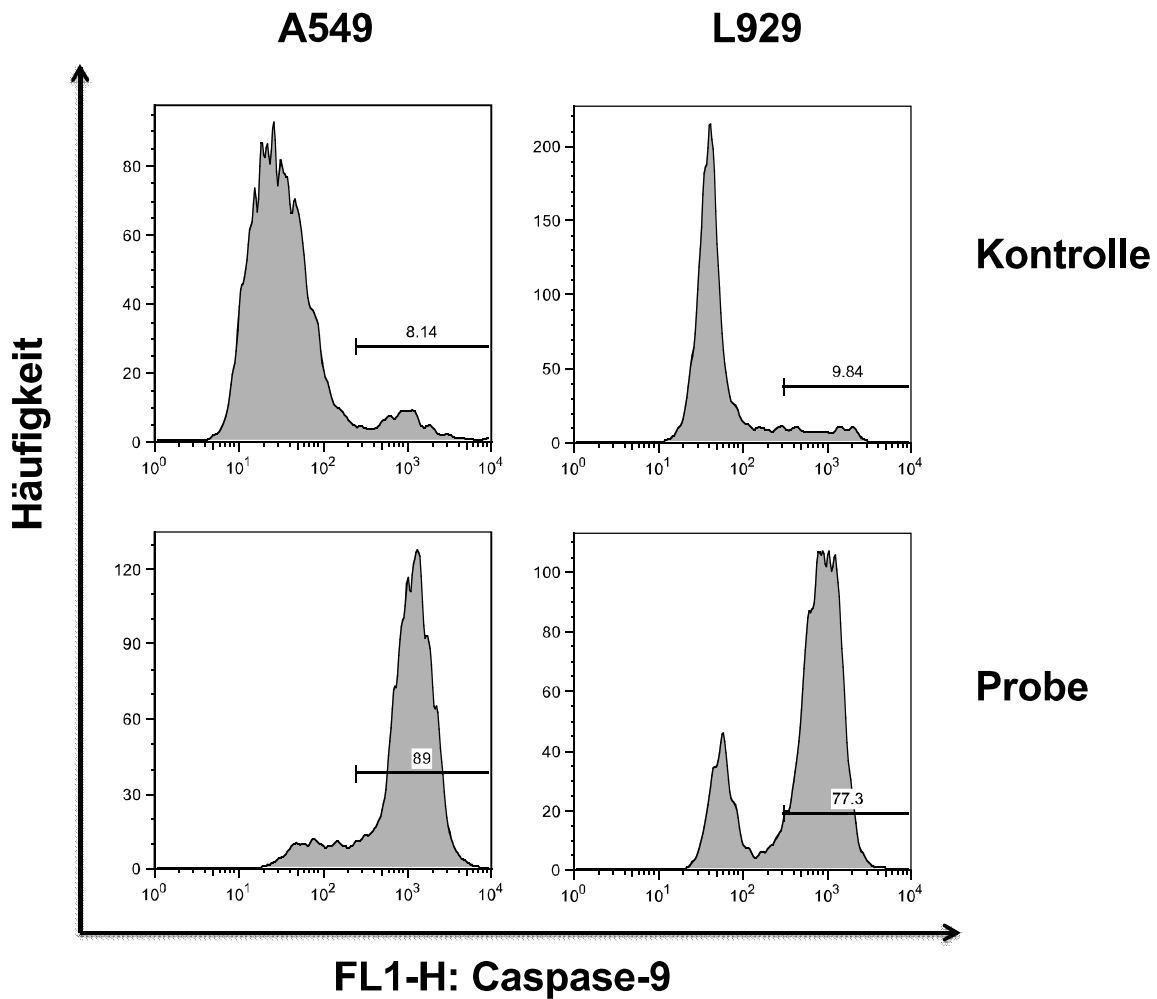


Abb. 3-17: Fluoreszenzmessung von Caspase-9: Die Grafik zeigt einen repräsentativen Versuch von A549 bzw. L929 Zellen nach Behandlung für 1 h mit Carbogen (Kontrolle) oder 1 h mit 0,2% w/w Ozon (Probe). Für die Darstellung wurde hier ein Histogramm gewählt, das die Fluoreszenzintensität (x-Achse) gegen die Häufigkeit (y-Achse) aufträgt. Das "gate" wurde anhand der Kontrollen so gewählt, dass ca. 10% der Zellen Caspase-9 positiv waren.

Die Auswertung der DotPlots mehrerer Versuche lieferte das in Abbildung 3-18 dargestellte Punktdiagramm.

Ergebnisse

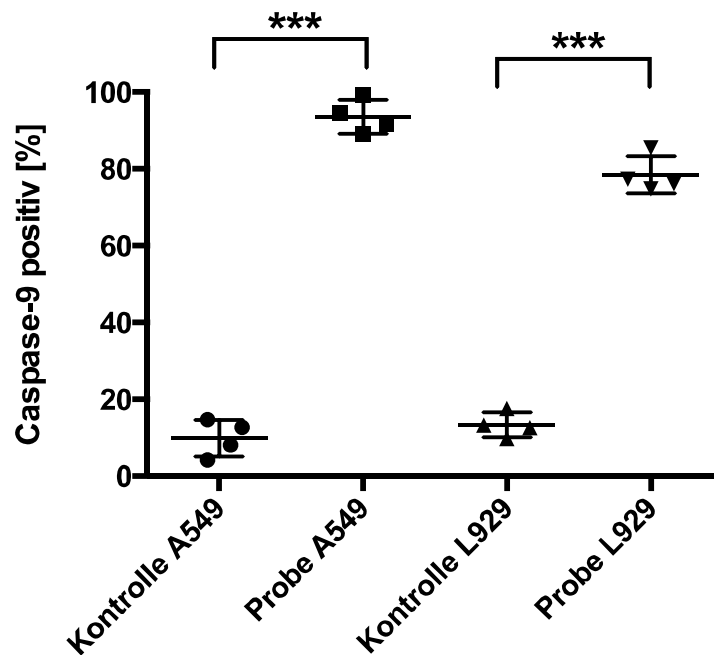


Abb. 3-18: Caspase-9 Aktivierung nach Ozonbehandlung: Exposition von A549 bzw. L929 Zellen für 1 h mit Carbogen (Kontrolle) oder 1 h mit 0,2% w/w Ozon (Probe). Dargestellt sind die Mittelwerte von Caspase-9 positiven Zellen [%] aus 4 unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung. $p < 0,001$ (***) markiert die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle.

Die untersuchten Caspase-9 Werte zeigten bei beiden Zelllinien eine signifikante Veränderung im Vergleich zu den Kontrollen. Der DNA-Schaden und der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führten letztlich zur Caspase-9 Aktivierung.

Wie in der Literatur beschrieben, haben sogenannte Initiatorcaspasen wie Caspase-8 oder Caspase-9 den Effekt, die Vorläuferform nachgeschalteter Effektorcaspasen wie Caspase-3 zu spalten und somit zu aktivieren.

Um nun eine Aussage über die Endstrecke der Caspase Kaskade treffen zu können, wurde im gleichen Versuchsaufbau Caspase-3 mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen.

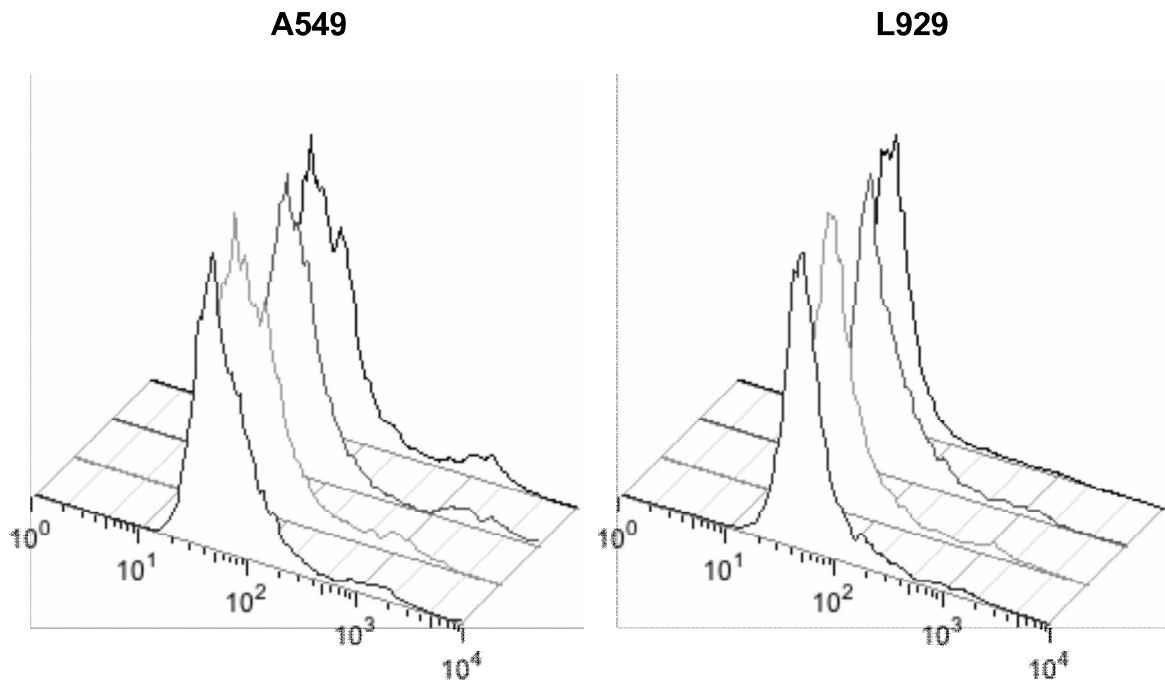


Abb. 3-19: Fluoreszenzmessung von Caspase-3: Die Grafik zeigt 4 unabhängige Versuche von A549 bzw. L929 Zellen nach Behandlung für 1 h mit Carbogen (Negativkontrolle). Für die Darstellung wurde hier ein Histogramm gewählt, das die Fluoreszenzintensität (x-Achse) gegen die Häufigkeit (y-Achse) aufträgt.

Abbildung 3-19 zeigt die Reproduzierbarkeit der Fluoreszenzmessung anhand von Kontrollversuchen.

Anhand eines Kontrollversuchs wurde mit dem Programm FlowJo ein Gate um die Caspase-3 positive Population gelegt, in dem die Zellzahl $\approx 10\%$ war. Zellen innerhalb dieses Gates wurden als Caspase-3 positiv, Zellen außerhalb dieses Gates als Caspase-3 negativ definiert. Abbildung 3-20 zeigt die Verteilung der Messereignisse eines repräsentativen Versuchs.

Die Auswertung der Messwerte mehrerer Versuche lieferte dabei eine signifikante Erhöhung der Caspase-3 nach Ozonbehandlung in beiden Zelllinien, wie in Abbildung 3-21 ersichtlich ist.

In beiden Zelllinien lief nach einem Ozonschaden kontrolliert durch p53 und der Caspase der Zelltod durch Apoptose ab. Zusammenfassend wurden alle nachgewiesenen Caspasen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht. Untereinander zeigten Caspase-3, -8 und -9 keine signifikanten Unterschiede.

Ergebnisse

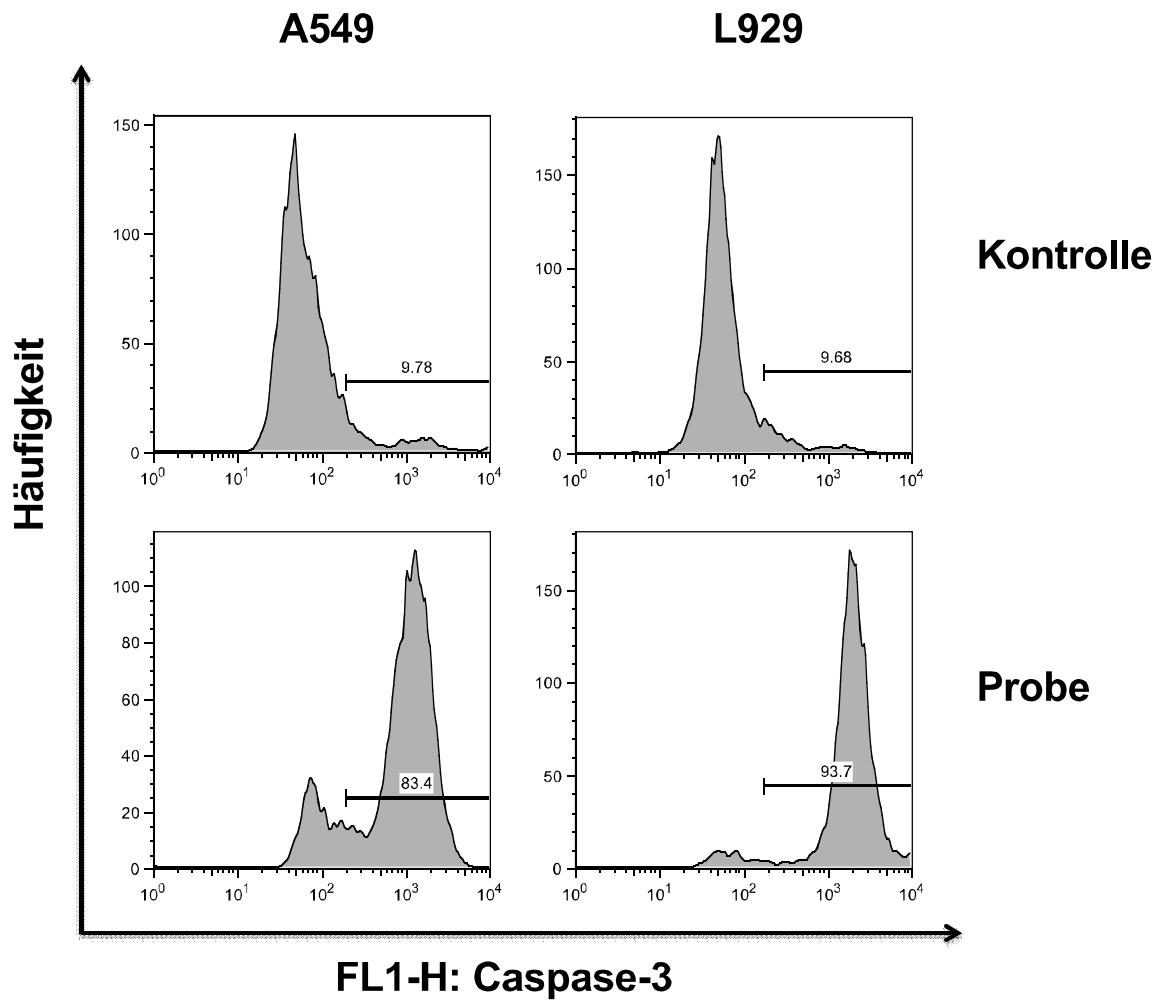


Abb. 3-20: Fluoreszenzmessung von Caspase-3: Die Grafik zeigt einen repräsentativen Versuch von A549 bzw. L929 Zellen nach Behandlung für 1 h mit Carbogen (Kontrolle) oder 1 h mit 0,2% w/w Ozon (Probe). Für die Darstellung wurde hier ein Histogramm gewählt, das die Fluoreszenzintensität (x-Achse) gegen die Häufigkeit (y-Achse) aufträgt. Das "gate" wurde anhand der Kontrollen so gewählt, dass ca. 10% der Zellen Caspase-3 positiv waren.

Ergebnisse

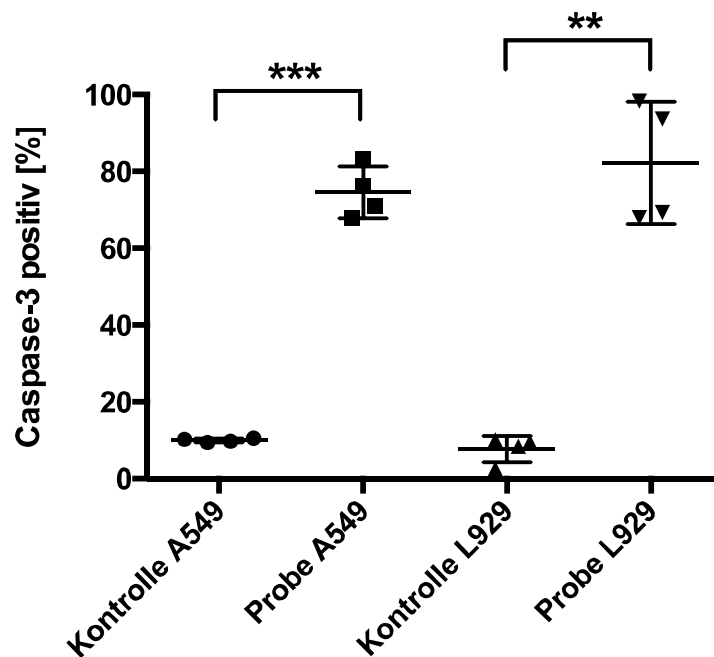


Abb. 3-21: Caspase-3 Aktivierung nach Ozonbehandlung: Exposition von A549 bzw. L929 Zellen für 1 h mit Carbogen (Kontrolle) oder 1 h mit 0,2% w/w Ozon (Probe). Dargestellt sind die Mittelwerte von Caspase-3 positiven Zellen [%] aus 4 unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung. $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) markieren die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle.

3.3.6 Anti-apoptotische Effekte

Um eine exakte Aussage über die Apoptose nach einem Ozonschaden treffen zu können, wurde zusätzlich eine Analyse des anti-apoptotischen Gens Bcl-2 durchgeführt. Wie bereits in Abschnitt 3.3.5 erwähnt, führt eine Hochregulation von p53 zu einer Aktivierung von Genen der Bcl2 Familie. Dazu gehören pro-apoptotische Gene wie z.B. BAX, welches die Cytochrom-c Ausschüttung und die Caspase Kaskade aktiviert und anti-apoptotische Gene wie z.B. Bcl2. Nach Ozonexposition wurde die Bcl2 Konzentration in beiden Zelllinien bestimmt. Jedoch war keine Erhöhung im Vergleich zu den Kontrollen sichtbar (Daten nicht gezeigt).

3.4 Antioxidative Effekte von Dimethylsulfoxid

3.4.1 Beeinflussung der Proliferationsaktivität

Zunächst war von Interesse, welche Effekte durch Zugabe von DMSO vor Ozonbehandlung erkennbar wurden. Dafür wurde der CFU Assay (siehe Abschnitt 2.2.3.12) zu Hilfe genommen. Nach Ozonexposition wurden die Zellen in 6-well Platten ausgesät, für 8 Tage in den Brutschrank gegeben und anschließend angefärbt. Abbildung 3-22 zeigt die Ergebnisse von A549 Zellen. Daten von L929 Zellen sind nicht gezeigt.

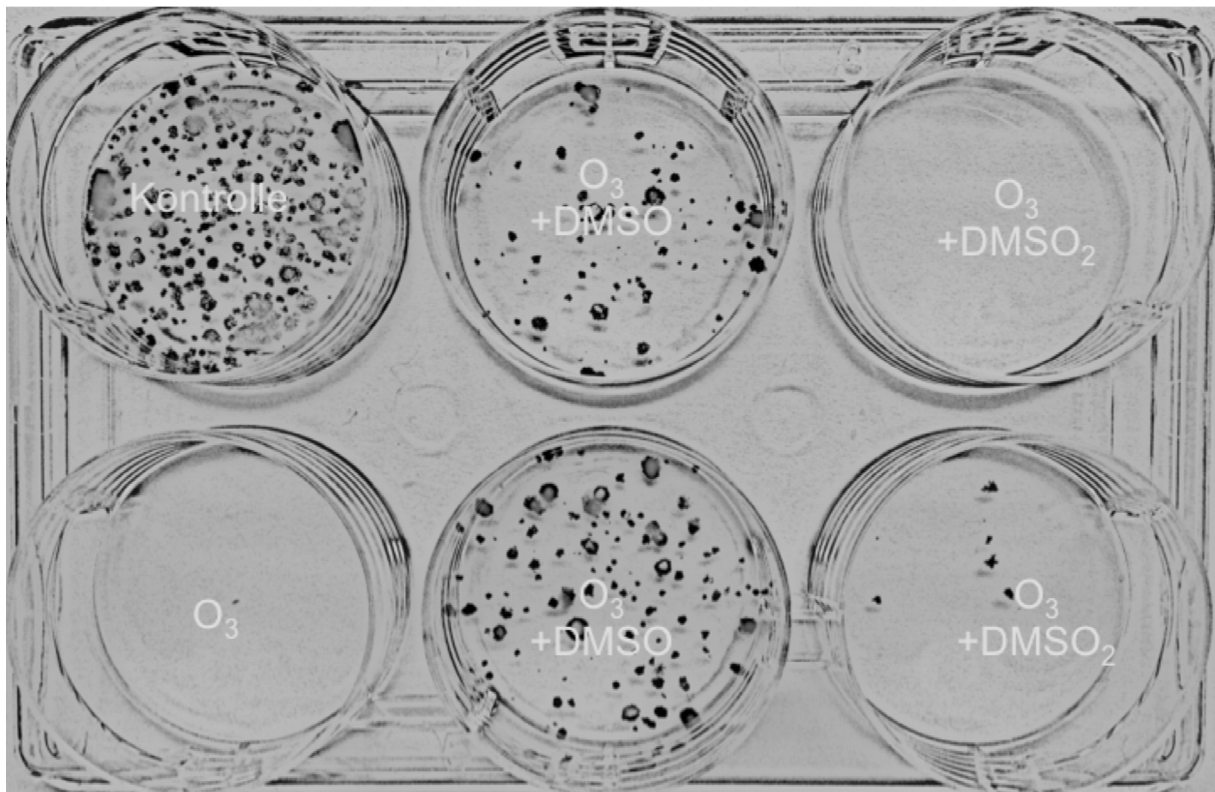


Abb. 3-22: Einfluss von DMSO und DMSO₂ auf die Proliferationsaktivität nach Ozonexposition: Exposition von A549 Zellen für 1 h mit Carbogen (Negativkontrolle) oder 1 h mit 0,2% w/w Ozon ±1% DMSO bzw. ±1% DMSO₂.

Ergebnisse

Während bei der O₃-Probe mit und ohne DMSO₂ keine Koloniebildung sichtbar war, war unter Anwesenheit von DMSO ein proliferativer Effekt sichtbar. Mit bloßem Auge war bei der Probe mit DMSO gegenüber der Kontrolle eine Abnahme der Koloniebildung um ca. 50% zu erkennen.

Zur genaueren Abklärung dieses protektiven Effekts von DMSO wurden die in 3.3 gemessenen Parameter wie die Induktion der Apoptose (Caspase-3 Assay), die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS Assay) und das Kollabieren des mitochondrialen Membranpotentials (JC-1 Assay) nochmals unter Anwesenheit von DMSO gemessen.

3.4.2 Einfluss auf das mitochondriale Membranpotential

Vorab sollte überprüft werden, ob die positiven Effekte wirklich antioxidativer Natur waren oder ob der Effekt nur dadurch zustande kam, dass Ozon mit DMSO reagiert und somit weniger Ozon die Zellen erreicht. Dafür wurde Harnstoff gewählt, ein dem DMSO strukturverwandtes Molekül (Abbildung 3-23). DMSO und Harnstoff wurde den Zellen vor Versuchsbeginn in einer Konzentration von 1% zugesetzt. Inwieweit Effekte bei einer Ozonkonzentration von 0,2% w/w sichtbar waren, ist in Abbildung 3-24 dargestellt.

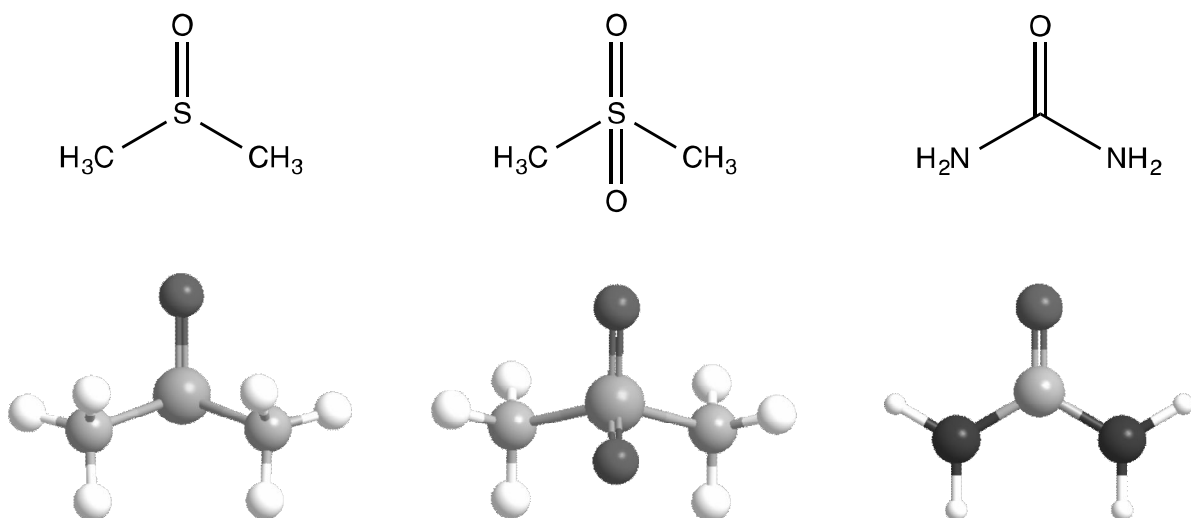


Abb. 3-23: Vergleich der Molekülstruktur von DMSO, DMSO₂ und Harnstoff

Ergebnisse

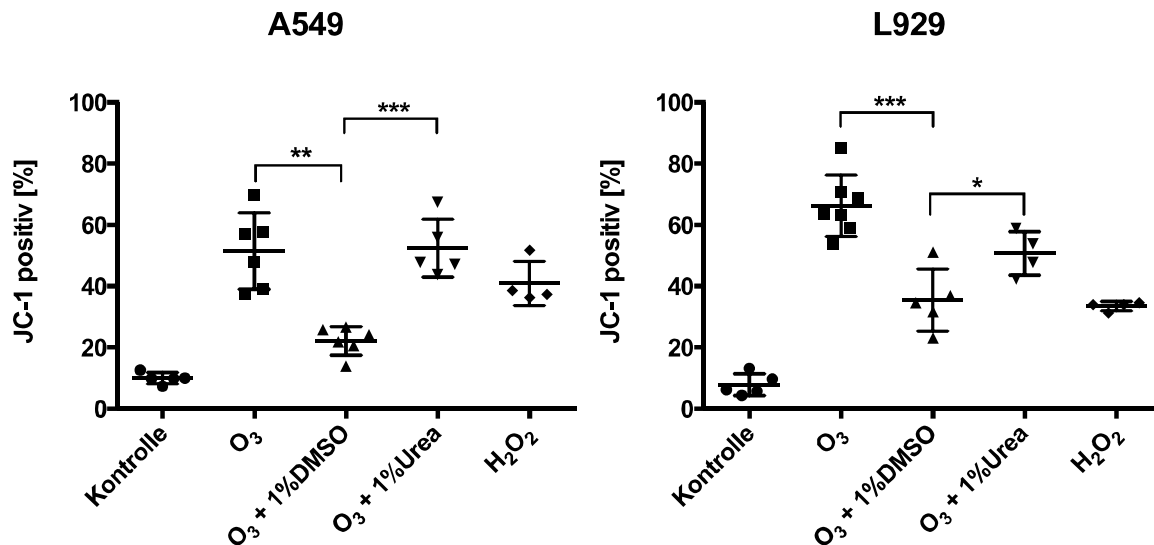


Abb. 3-24: Einfluss von DMSO und Urea auf das mitochondriale Membranpotential während Ozonbehandlung: Exposition von A549 bzw. L929 Zellen für 1 h mit Carbogen (Negativkontrolle), 0,2% w/w Ozon \pm 1% DMSO bzw. \pm 1% Urea oder für 10 min mit 1 mM H₂O₂ (Positivkontrolle). Dargestellt sind die Mittelwerte von JC-1 positiven Zellen [%] aus mindestens 4 unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung. $p < 0,1$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) markieren die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle.

Wie ersichtlich ist, war bei Harnstoff keine signifikante Minderung der JC-1 positiven Zellen im Vergleich zur Fraktion ohne Zusatz sichtbar. Dies galt für beide Zelllinien. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von DMSO bei den A549 und L929 Zellen zu einer signifikanten Reduktion der JC-1 positiven Zellen sowohl gegenüber der Fraktion ohne Zusatz als auch gegenüber der Fraktion mit Harnstoff.

Als Ergänzung zur Frage der schützenden Wirkung sollte geklärt werden, ob die oxidierte Form von DMSO, das Dimethylsulfoxid (DMSO₂), auch in der Lage ist, die Zellen vor Ozon zu schützen. DMSO und DMSO₂ wurden in einer Konzentration von jeweils 1% in die Zellsuspension gegeben, die anschließend für 1h mit einer Ozonkonzentration von 0,2% w/w für 1 h behandelt wurde. Die Auswirkung auf das Membranpotential ist in Abbildung 3-25 graphisch dargestellt.

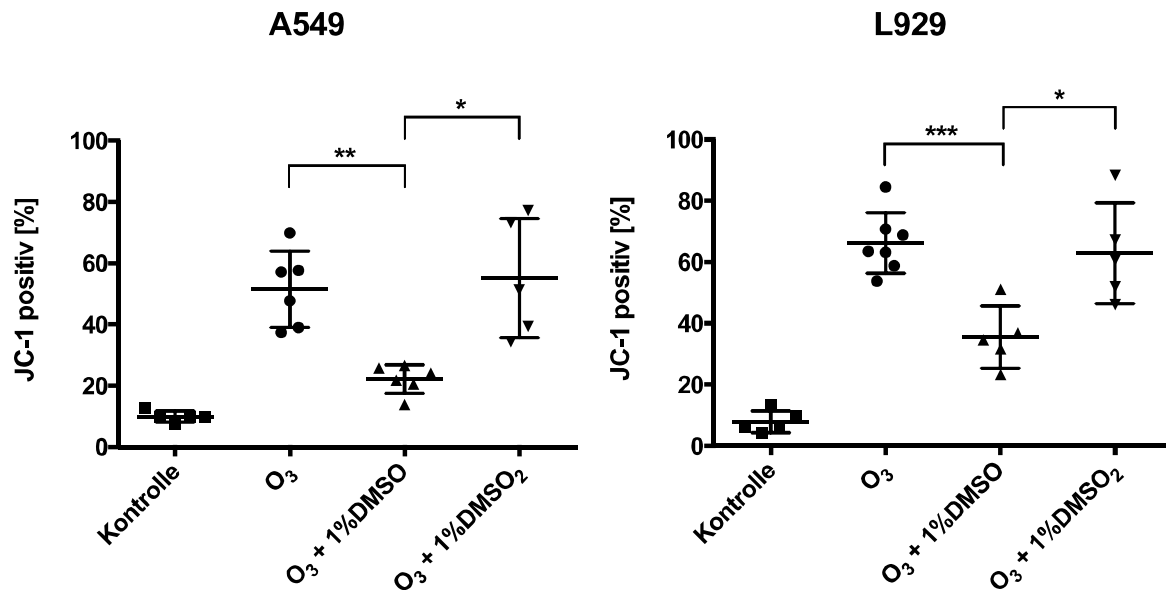


Abb. 3-25: Einfluss von DMSO und DMSO₂ auf das mitochondriale Membranpotential während der Ozonbehandlung: Exposition von A549 bzw. L929 Zellen für 1 h mit Carbogen (Kontrolle) oder 0,2% w/w Ozon \pm 1% DMSO bzw. \pm 1% DMSO₂. Dargestellt sind die Mittelwerte von JC-1 positiven Zellen [%] aus mindestens 5 unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung. $p < 0,1$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) markieren die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle.

DMSO₂ zeigte nicht die gleichen Eigenschaften wie DMSO. In beiden Zelllinien war die Zahl JC-1 positiver Zellen, bei der Fraktion in der DMSO₂ enthalten war, im Vergleich zu den anderen Fraktionen nicht signifikant erniedrigt. Es war lediglich bei der Fraktion mit DMSO im Vergleich zur Fraktion ohne Zusatz und im Vergleich zur Fraktion mit DMSO₂ eine signifikante Reduktion der JC-1-positiven Zellen ersichtlich.

3.4.3 Effekt auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Nachdem DMSO offenbar die Fraktion der Zellen mit kollabiertem Membranpotential verringerte, stellte sich die Frage, inwieweit DMSO die Bildung von ROS verhindert. Dies sollte auch im Vergleich von DMSO und DMSO₂ geprüft werden.

Ergebnisse

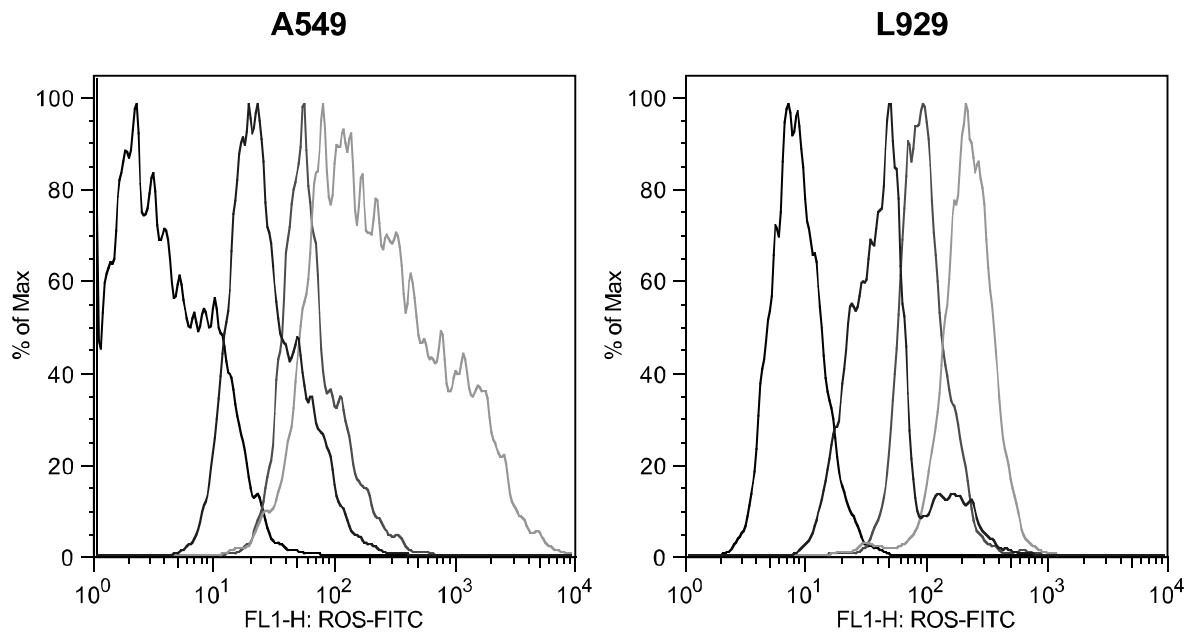


Abb. 3-26: Bildung von ROS nach Ozon-Exposition unter Anwesenheit von DMSO: Die Grafik zeigt A549 bzw. L929 Zellen nach Behandlung für 1 h mit Carbogen (Kontrolle=schwarz), 0,2% w/w Ozon (Probe=rot) oder 0,2% w/w. Ozon + 1% DMSO (Probe=blau). 1 mM H_2O_2 wurden für 10 min zugegeben (Positivkontrolle=grün). Für die Darstellung wurde hier ein Histogramm gewählt, das die Fluoreszenzintensität (x-Achse) gegen die Häufigkeit (y-Achse) aufträgt.

Aus Abbildung 3-26 ist ersichtlich, dass in den Proben mit 1% DMSO die Fluoreszenzintensität geringer ausfällt als bei den Proben ohne DMSO. Die stärkste Fluoreszenzintensität zeigt die Positivkontrolle mit H_2O_2 . Die genaue Auswertung dieser Histogramme lieferte folgende Zahlenwerte, die in Abbildung 3-27 zu sehen sind.

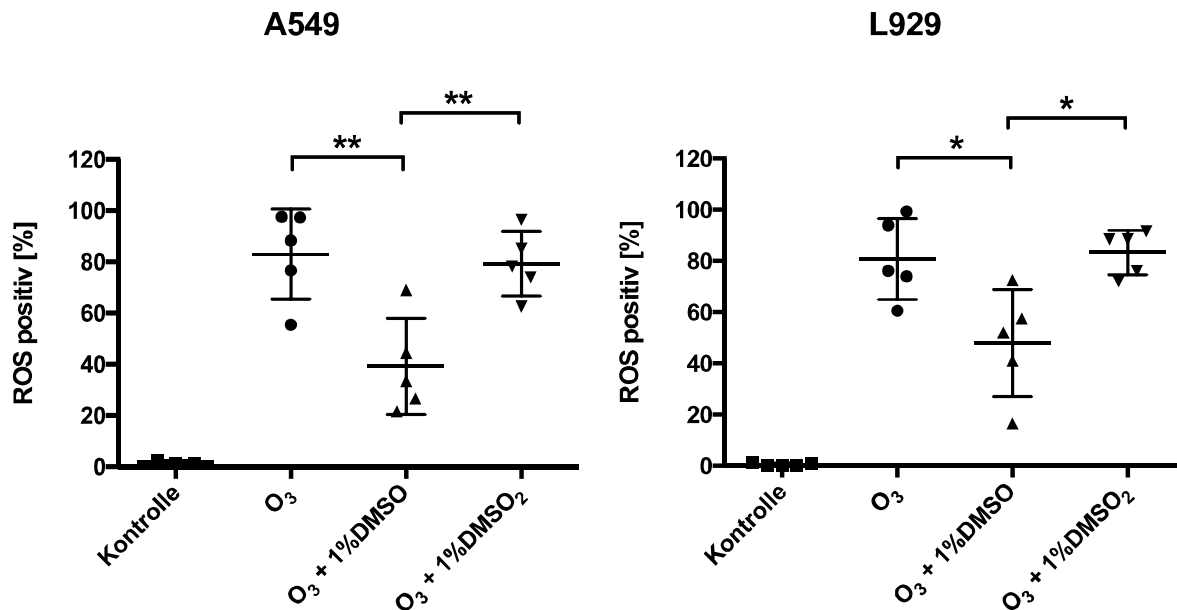


Abb. 3-27: Bildung von ROS nach DMSO/DMSO₂ Zugabe während Ozon-Exposition: Exposition von A549 bzw. L929 Zellen für 1 h mit Carbogen (Kontrolle) oder 0,2% w/w Ozon ±1% DMSO bzw. ±1% DMSO₂. Dargestellt sind die Mittelwerte von ROS positiven Zellen [%] aus 5 unabhängigen Versuchen ± Standardabweichung. $p < 0,1$ (*) und $p < 0,01$ (**) markieren die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle.

In beiden Zelllinien konnte eine signifikant verminderte Zahl von ROS positiven Zellen durch DMSO Zusatz gezeigt werden, sowohl gegenüber der Probe ohne Zusatz als auch gegenüber der Probe mit DMSO₂ Zusatz. Für DMSO₂ konnte kein antioxidativer Effekt nachgewiesen werden.

3.4.4 Auswirkung auf die Caspase Kaskade

Wie bereits in Abschnitt 3.3 gezeigt, führte Ozon zur Aktivierung der Caspase Kaskade. Nun sollte überprüft werden, ob auch hier unter Anwesenheit von DMSO ein protektiver Effekt an den Zelllinien zu erkennen war. Dabei wurden die Zellsuspensionen von A549 und L929 Zellen in vier Fraktionen geteilt: Negativkontrolle, Probe ohne DMSO, Probe mit 1% DMSO, Probe mit 1% DMSO₂, wobei DMSO und DMSO₂ jeweils vor Versuchsbeginn zugegeben wurden. Diese Fraktionen wurden anschlie-

Ergebnisse

ßend für 1 h mit 0,2% w/w Ozon behandelt. Die Abbildung 3-28 zeigt dazu die Ergebnisse.

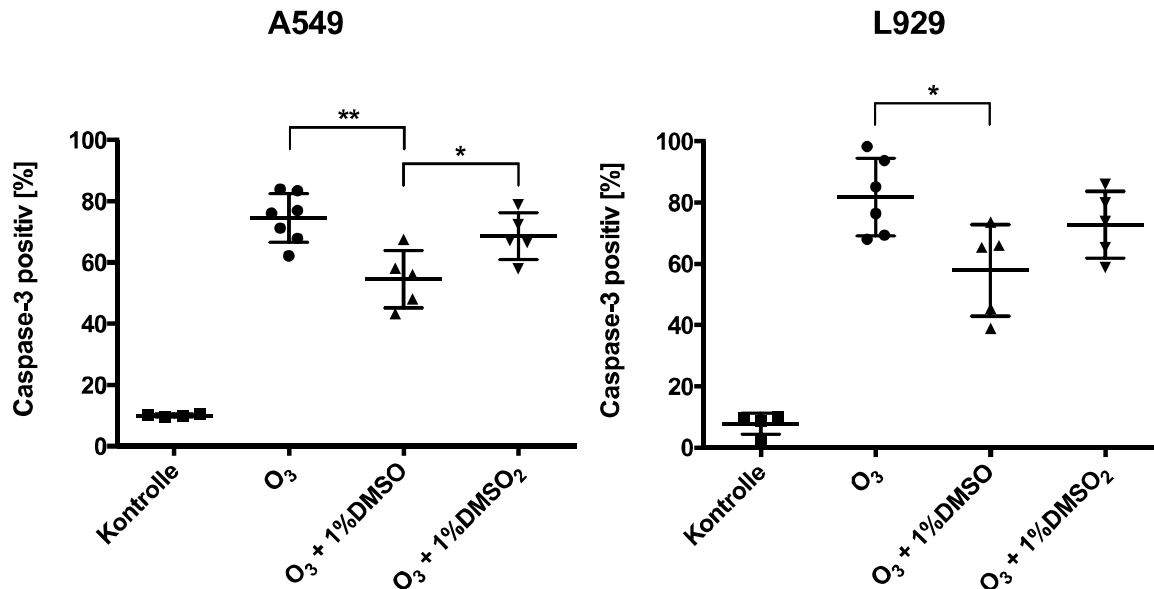


Abb. 3-28: Caspase-3 Aktivierung nach DMSO/DMSO₂ Zugabe während Ozonbehandlung: Exposition von A549 bzw. L929 Zellen für 1 h mit Carbogen (Kontrolle) oder 0,2% w/w Ozon ±1% DMSO bzw. ±1% DMSO₂. Dargestellt sind die Mittelwerte von Caspase-3 positiven Zellen [%] aus mindestens 4 unabhängigen Versuchen ± Standardabweichung. $p < 0,1$ (*) und $p < 0,01$ (**) markieren die statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle.

Der Caspase-3 positive Anteil war in beiden Zelllinien in der Fraktion mit 1% DMSO im Vergleich zu der Fraktion ohne Zusatz signifikant verringert. Wie schon bei den Versuchen zur ROS-Bildung und zur Depolarisation des Membranpotentials gezeigt, hatte die oxidierte Form von DMSO, das DMSO₂, keinen signifikanten Effekt auf die Caspase.

4. Diskussion

Das Bild einer Ozonvergiftung unter Hochdosis-Bedingungen ($\geq 400 \text{ mg/m}^3$) unterscheidet sich qualitativ von der sogenannten Umweltexposition ($\pm 0,24 \text{ mg/m}^3$). Die Gefahr des Soforttods oder, ein Lungenödem und anschließend eine Fibrose zu entwickeln, ist bei Umweltkonzentrationen im Gegensatz zu technischen Konzentrationen nicht vorhanden. Somit bieten Expositionsapparaturen eine Möglichkeit, volatile Gifte von hoher Konzentration an isolierten Zellmodellen zu untersuchen. Ziel der Arbeit war es, anhand der vorliegenden Expositionsapparatur die Wirkung von hochdosiertem Ozon auf zellulärer Ebene zu untersuchen und die Brauchbarkeit klassischer Endpunkte einer Zytotoxizität in diesem Szenario zu überprüfen. Schließlich sollte die antioxidative Wirkung von DMSO als Schutz der Zellen vor dem oxidativen Einfluss von Ozon im Vergleich zu strukturverwandten Stoffen ohne antioxidative Eigenschaften untersucht werden. Tabelle 4-1 fasst die Ergebnisse der einzelnen Versuche zusammen. Es zeigte sich, dass in den Zellen nach konzentrierter Ozonexposition klassische apoptotische Signale wie Caspase und p53 durch Ozon im Vergleich zu Carbogen (Kontrolle) verändert waren. Daneben machte der Einsatz des JC-1 und des ROS-Kits den oxidativen Schaden deutlich. In diesen Fällen zeigte DMSO einen mitigierenden Effekt.

Tabelle 4-1: Befunde zur Ozon-Toxizität und zur DMSO-Wirkung

	In-vitro-Toxizität			Antioxidative Effekte (+DMSO)		
	A549		L929	A549		L929
Membrantoxizität						
Trypanblau EC ₅₀ [%w/w]	0,2 Abb. 3-6	✓	0,3 Abb.3-7	✗		
AnnexinV	n.n.	✓	n.n.	✗		
Metabolische Toxizität						
GSX EC ₅₀ [%w/w]	0,2 Abb. 3-6	✓	0,3 Abb.3-7	✗		
XTT EC ₅₀ [%w/w]	0,2 Abb. 3-6	✓	0,3 Abb.3-7	✗		
Caspase-8-positiv [%]	75 Abb. 3-10	✓	80	✗		
ROS-positiv [%]	85 Abb. 3-12	✓	80	40 Abb. 3-27	✓	50
JC-1-positiv [%]	50 Abb. 3-14	✓	65	25 Abb. 3-25	✓	35
p53 [U/mL]	+20 Abb. 3-15	✓	+15	✗		
Caspase-9-positiv [%]	95 Abb. 3-18	✓	80	✗		
Caspase-3-positiv [%]	75 Abb. 3-21	✓	85	55 Abb. 3-28	✓	60
Bcl-2	o.B.	✓	o.B.	✗		
Proliferationstoxizität						
CFU-Assay	✓ Abb. 3-22			✓ Abb. 3-22		
Morphologie						
Holo-Monitor	✓ Abb. 3-2 bis 3-5			✗		

4.1 Kritische Betrachtung der Versuchsbedingungen

4.1.1 Schwierigkeiten bei der Einschätzung der Ozonlöslichkeit

Der Einsatz von Ozon mit seiner ausgeprägten Oxidationskraft ($E^0 \approx +2.0V$) ist für die Dosimetrie eine Herausforderung. Bereits ohne biologische Phänomene geht ein Teil des Ozons bei der Durchströmung der Apparatur „verloren“. Neben dieser unspezifischen Abreaktion des Gases waren zwei Grenzflächendurchtritte zu beachten, die sich durch den Übertritt des Ozons aus der Gas- in die Flüssigphase und den Übertritt aus der Flüssigphase in bzw. an die biologischen Strukturen ergibt. Zu letzteren zählen die Zellmembranen mit ihren diversen Oberflächenmerkmalen genauso wie irgendwelche von den Zellen in die Lösung sezernierte Bestandteile. Die am Ozongenerator eingestellte Konzentration entsprach der Konzentration in der Gasphase. Wie viel davon solvatisiert wurde, konnte zwar theoretisch berechnet werden, aber über die Geschwindigkeit des Phasendurchgangs und die Zeitdauer bis zur Gleichgewichtseinstellung im System herrschten keine klaren Erkenntnisse. Hier bot sich die Verifikation mit Indigokarmin an, um Auskunft über die tatsächlichen Verhältnisse in der gelösten Phase zu erhalten. Die theoretisch ermittelten Werte aus Tabelle 3 – 3 stimmten mit den in der Literatur gefundenen Werten überein [Ozone-Solutions, 2014; Von Sonntag, 2012].

Für die Versuche mit Indigokarmin waren konstante Reaktionsbedingungen wie die konstante Temperatur (37°C) in der Expositions-kammer, ein konstanter Gasfluss (200 ml/min) und ein konstantes Volumen (4 ml Zellsuspension in HBSS) nötig. Nur so konnte eine Reproduzierbarkeit der Versuche gewährleistet werden.

Im Vergleich geht bis zum Zeitpunkt 2 min weniger Ozon in Lösung als theoretisch berechnet. Ein möglicher Grund für die Abweichung der Ozon-Indigokarmin-Reaktion von der Theorie ist, dass dem Ozon andere Reaktionspartner zur Verfügung stehen. Ebenso wäre möglich, dass die Einstellung des steady-state in der Apparatur durch das beträchtliche Totraumvolumen eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt (sog. Latenzzeit) In der Literatur wird beschrieben, dass das aus Indigokarmin entstehende Isatin-5-sulfonat weiter mit Ozon reagiert, so dass die Kinetik nur bis zu einem ca. 40%-igen Ausbleichen der Lösung stöchiometrisch verläuft [Guicherit, 1972; Kettle,

2004]. Damit ist ab dem Zeitpunkt 5 min die angebbare Ozonkonzentration zunehmend fehlerträchtig. Nachdem die Abweichung von theoretischer und praktischer Berechnung aber bis Minute 5 maximal 17% ist, ist Indigokarmin ein ausreichend guter Indikator zur Abschätzung der gelösten Ozonkonzentration.

Als Nachteil erscheint, dass nicht überprüft werden kann, ob die eingestellten Ozongehalte auch unterschiedlich an den Zellen ankommen oder ob Ozon eine veränderte Löslichkeit in Wasser, das eine hohe Konzentration an Indigokarmin enthält, besitzt. Die Gründe hierfür sind die Sättigung mit Indigokarmin und der schnelle Reaktionsablauf, der am Photometer z.B. durch Nachreaktionen falsch eingeschätzt wird.

Der Vorteil von Indigokarmin ist die Eigenschaft, dass es sich hierbei um einen Farbstoff handelt, der für die Zellen nicht toxisch ist [Kim, 2013]. Eine Ozonexposition von Zellen unter gleichzeitiger Anwesenheit von Indigokarmin wurde jedoch nicht durchgeführt. Dies hätte in den vorliegenden Versuchsabläufen zu einer bis zur vollständigen Oxidation des Indigokarmins nicht genau angebbaren Ozonexposition der Zellen geführt. Vielmehr sollte ein Medium verwendet werden, in dem dem Ozon möglichst wenig gelöste Reaktionspartner zur Verfügung stehen, da die HWZ von Ozon in Pufferlösungen mit den zahlreichen Ionen kürzer ist als in Reinstwasser [Eriksson, 2005].

4.1.2 Indirektes Expositionsmodell als Methode der Wahl für Zellsuspensionen

Nachdem die Versuche zur Löslichkeit von Ozon in der vorliegenden Versuchsausrüstung unter ständigem Schaukeln der Expositions-kammer durchgeführt wurden, sollten diese Bedingungen auch bei den Zellexperimenten herrschen. Betrachtet man die Zelle als einen Würfel, der mit anderen „Würfeln“ an der apikalen Zirkumferenz über eine Zonula occludens verbunden ist, dann wird bei einem konfluenten Zellrasen rund 1/6 der Zelloberfläche, nämlich die apikale Seite, dem Ozon unmittelbar ausgesetzt. Im Gegensatz dazu ist in Suspension (sphärische Geometrie der vereinzelter Zellen) die gesamte Zelloberfläche dem Ozon ausgesetzt. Zwar entspricht das

adhärente Modell den In-vivo-Gegebenheiten, jedoch war in den vorliegenden Versuchen vor allem die Reaktionen der isolierten Zellen von Interesse. Reparatur- bzw. Schutzmechanismen, die im Zellverbund stattfinden, konnten somit ausgeschlossen werden. Die in der Literatur beschriebenen direkten Methoden der Exposition von Zellen [Rach, 2014; Panas, 2014] können nur mit einem adhärenen Zellrasen stattfinden. Die hier angewendete indirekte Methode bietet die Möglichkeit, Einzelzellen zu exponieren und diese durch die Auslenkbewegung der Apparatur in Suspension zu halten (siehe Abbildung 2-2).

Ein charakteristisches morphologisches Merkmal apoptotischer Zellen ist das „Blebbing“ der Plasmamembran. Betrachtete man nun die adhärenen und suspendierten Zellen, konnte das in der Literatur für A549 [Sun, 2012] und L929 [Tinevez, 2009] beschriebene Phänomen bei den gewählten Ozonkonzentrationen nicht beobachtet werden. Für adhärenen HeLa-Zellen und suspendierte Jurkat-Zellen konnte gezeigt werden, dass dem „blebbing“ eine Phosphatidylserin-Exposition folgt [Lane, 2005]. Dieses Merkmal und ein positives AnnexinV-Signal waren in den hier berichteten Versuchen nicht nachweisbar. Aufgrund der sehr hohen Ozonkonzentration liegt der Verdacht nahe, dass eine Oxidation der Bestandteile [Pryor, 1991, 1995] der Zellmembran zum Verlust der Membranfluidität oder zu einer oxidativen Veränderung kritischer Reaktionszentren führte. Ob dann die Translokation der Phosphatidylserin-Köpfe von intra- nach extrazellulär verhindert wurde oder ein anderes Phänomen der Grund für das Ausbleiben des Signals war, muss offen bleiben.

4.2 Validität der Versuche

Aufgrund der starken Oxidationskraft von Ozon musste mit Veränderungen an der Zelloberfläche und im Zellinneren gerechnet werden. Unklar war, ob die Endpunkte für Zytotoxizität auch bei sehr hohen Ozongehalten valide sind. Die Hersteller der Testkits konnten dazu keine Auskunft geben. Nachdem bei allen Versuchen die Zellen zunächst gewaschen und in frischem Medium resuspendiert worden waren, sollte Ozon aufgrund der hohen Reaktivität nicht mehr in der Suspension vorhanden sein. Erst dann wurden die einzelnen Marker auf die Zellen gegeben. Somit konnte eine

Reaktion der einzelnen Versuchsmarker mit Ozon praktisch ausgeschlossen werden. Außerdem erfolgten alle Versuche mit Negativ- und Positivkontrollen. Letzteres war H_2O_2 , eine dem Ozon in puncto Oxidationskraft ($E^0 \approx +1.8\text{V}$) ähnliche Substanz. Eine Exposition mit H_2O_2 führte bei den Endpunkten p53, Caspase, JC-1 und ROS zu ähnlichen Ergebnissen wie mit Ozon.

Für die untersuchten Caspasen war bekannt, dass der Marker spezifisch an das aktive Enzym bindet. Diese Endpunkte waren auch bei hohen Ozonkonzentrationen valide, denn wären durch Ozon kritische Veränderungen an den Enzymen induziert worden, hätten diese Marker nicht mehr gebunden.

Im Fall der JC-1 Versuche konnte gezeigt werden, dass das Membranpotential abhängig von der Ozonkonzentration kollabiert. Dieser beobachtete Verlauf des Zusammenbruchs, und die Tatsache, dass H_2O_2 ähnliche Ergebnisse lieferte, spricht für die Robustheit des JC-1 Assay. Es spricht auch für eine rasche Zersetzung des Ozons, so dass keine Restaktivität mehr vorhanden war, die zum Ausbleichen des Fluoreszenzmarkers geführt hätte.

Negativ war das Annexin V Signal. Das Ausbleiben des Signals könnte Ausdruck einer fehlenden Translokation der PS-Köpfe von intra- nach extrazellulär sein. Das fehlende Annexin V Signal wird in Abschnitt 4.5 ausführlicher diskutiert.

4.3 Probleme bei der Wahl der Zelllinien

Die Auswahl geeigneter Zelllinien für In-vitro-Untersuchungen wird gern mit der besseren Übertragbarkeit der In-vitro- auf die In-vivo-Situation begründet, die zu gegebener Zeit von Interesse ist. A549-Zellen aus einem Adenokarzinom einer menschlichen Lunge tragen Merkmale von Lungenzellen, z.B. Surfactantproduktion wie bei Alveolarepithelzellen vom Typ II [Lieber, 1976]. Zum Vergleich wurde die L929-Zelllinie ausgewählt, eine Fibroblasten-Zelllinie murinen Ursprungs, die für Reaktionen des pulmonalen Stromas auf eine Reizgas- bzw. Ozonintoxikation steht [Van Der Zee, 1987].

Durch Ozon verursachte oxidative Schäden äußerten sich in A549-Zellen als DNA Einzelstrangbrüche [Cheng, 2003], Schäden durch H_2O_2 dagegen als Vitalitätsverlust

(Trypanblau- und MTT-Assay) sowie als Caspase-3 und -8 Aktivierung [Dandrea, 2004]. Dies entsprach in vollem Umfang den eigenen Versuchsergebnissen mit Ozon bzw H_2O_2 .

Ähnliches galt für die L929 Zellen, an denen bereits die Inaktivierung von Enzymen, eine Reduktion des intrazellulären GSH-Gehalts [Van Der Zee, 1987] sowie DNA-Schäden [Van der Zee, 1987] durch Ozon gezeigt wurden. Apoptotische Signale durch H_2O_2 , wie die Depolarisation der Mitochondrienmembran und die Cytochrom-c-Freisetzung aus den Mitochondrien [Takeyama, 2002], sind vergleichbar mit der durch Ozon induzierten Membrandepolarisation der Mitochondrien und der Caspase-Aktivierung der L929 Zellen in den hier geschilderten Versuchen.

Bei den quantitativen Endpunkten waren geringfügige Unterschiede zu sehen. A549-Zellen zeigten eine leicht erhöhte Empfindlichkeit bei der Bildung von p53- und Caspase-9-Werten im Gegensatz zu L929-Zellen.

Ein direkter Vergleich der Reaktion der beiden Zelllinien auf hohe Ozon-Konzentrationen wurde in der Literatur bisher noch nicht durchgeführt. Die in der Literatur beschriebene ROS-Bildung nach TNF-Behandlung fiel in L929-Zellen stärker aus als in A549-Zellen [Xie, 2005]. Im Gegensatz dazu verhielten sich die beiden Zelllinien bezüglich der ROS-Bildung nach Ozonexposition annähernd identisch.

4.4 Ozon und die Folgeprodukte

Ozon zählt zu den nicht-radikalischen oxidierenden Verbindungen, welche leicht in radikalische Verbindungen übergehen können. Ozon selbst ist in wässrigen Lösungen instabil. Durch die Reaktion mit Hydroxidionen bilden sich Hydroxylradikale [Von Sonntag, 2012]. In den Versuchen dieser Arbeit war die wässrige Lösung ein Puffer (HBSS), der verschiedene anorganische Salze und Glucose enthielt. Bei der Reaktion von Ozon mit Glucose entstehen Glucoseradikale, aber auch Hydroxylradikale, welche wiederum zu verschiedenen Produkten wie der Gluconsäure oder der D-gluco-Hexodialdose führen (siehe Abbildung 4-1) [Schuchmann, 1989; Von Sonntag, 2012].

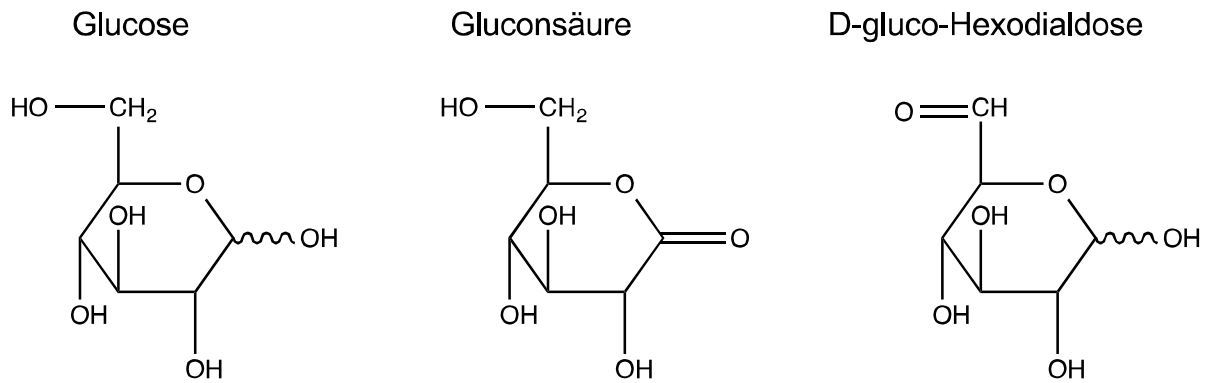


Abb. 4-1 Folgeprodukte von Glucose nach Reaktion mit Ozon: Aus Glucose (Links) entstehen nach Reaktion mit Ozon, Gluconsäure (Mitte) und D-gluco-Hexodialdose (Rechts).

Außer mit den Komponenten des Mediums hat das gelöste Ozonmolekül Kontakt mit der Außenhülle der Zellen, der Zellmembran. Hier kann Ozon mit den ungesättigten Fettsäuren der Plasmamembran reagieren, wobei toxische Abbauprodukte wie Aldehyde und H_2O_2 entstehen [Pryor, 1991; Santrock, 1992]. Letzteres kann als nicht radikalische Verbindung leicht in eine radikalische Verbindung zerfallen. Daneben entstehen hochreaktive Lipidperoxidradikale (siehe Abbildung 4-2), die ihrerseits Zellbestandteile angreifen [Valko, 2007].

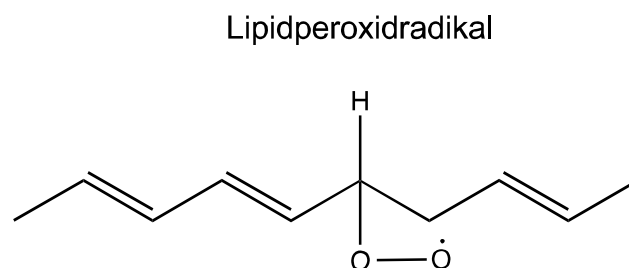


Abb. 4-2 Lipidperoxidradikal als toxisches Abbauprodukt: Aus Ozon entstehen nach Reaktion mit der Plasmamembran toxische Folgeprodukte wie Lipidperoxidradikale.

Dem Ozon stehen also diverse Reaktionspartner zur Verfügung, um Hydroxid- und Lipidperoxidradikale zu bilden. Diese führen laut Kosmider et al. in alveolaren Epithelzellen Typ I zu einer Erhöhung der intrazellulären ROS nach Ozonexposition

[Kosmider, 2010]. Diese sind für den Schaden an der DNA verantwortlich, weniger das Ozon selbst [Kosmider, 2010]. Bereits geringe Ozonkonzentrationen (80 ppb) zeigten einen Anstieg der intrazellulären ROS in A549 Zellen [Cheng, 2003].

Bei unseren Versuchen übten Ozon und Wasserstoffperoxid in A549 und L929 Zellen oxidativen Stress aus, gemessen anhand der intrazellulären ROS-Bildung. Unter physiologischen Bedingungen besitzt die Zelle Kapazitäten, um ROS abzufangen und es herrscht ein Redox-Gleichgewicht. In unserem Fall jedoch überschreitet die ROS-Bildung offenbar die antioxidative Kapazität der Zellen, was an dem Abfall des Gesamtglutathiongehaltes (GSX) erkennbar war. Eine genauere Aussage zum oxidativen Stress in Zellen kann allerdings nur über das Verhältnis GSH / GSSG getroffen werden [Valko, 2007]. Messungen dazu wurden nicht durchgeführt.

Mit einer Erhöhung der ROS ging auch ein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials einher. Dieser Zusammenhang war in A549-Zellen zu sehen, welche mit Tanshinone IIA, einem Inhaltsstoff des Rotwurzelsalbeis, inkubiert wurden [ChiuSu, 2010]. Bei der Exposition von A549 und L929 Zellen gegenüber Ozon zeigte sich ebenfalls ein dosisabhängiger Zusammenbruch des Membranpotentials der Mitochondrien.

Aus In-vivo-Studien war bekannt, dass eine anhaltende Exposition mit Lungenschadstoffen zu einer ROS-Bildung in Zellen und Geweben führt, was wiederum zu chronischen Entzündungsreaktionen Anlass gibt [Azad, 2008]. In-vivo werden bei dieser Entzündungsreaktion noch Immunzellen, wie z.B. Monozyten und Leukozyten, angelockt. Hier wäre für weiterführende Versuche das erwähnte „Vitrocell®“ Modell (vgl. Abschnitt 1.3) mit einem Zell-Bilayer von Interesse.

4.5 Zelltodmarker nach Ozonexposition

Die Auswirkungen von ROS und oxidativem Stress auf Zellen werden sowohl mit dem nicht-programmierten Zelltod (Nekrose), dem programmierten Zelltod (Apoptose) als auch mit der Autophagie in Verbindung gebracht [Jin, 2012; Sunil, 2012]. Abbildung 4-3 schlüsselt die unterschiedlichen Arten des Zelltods auf.

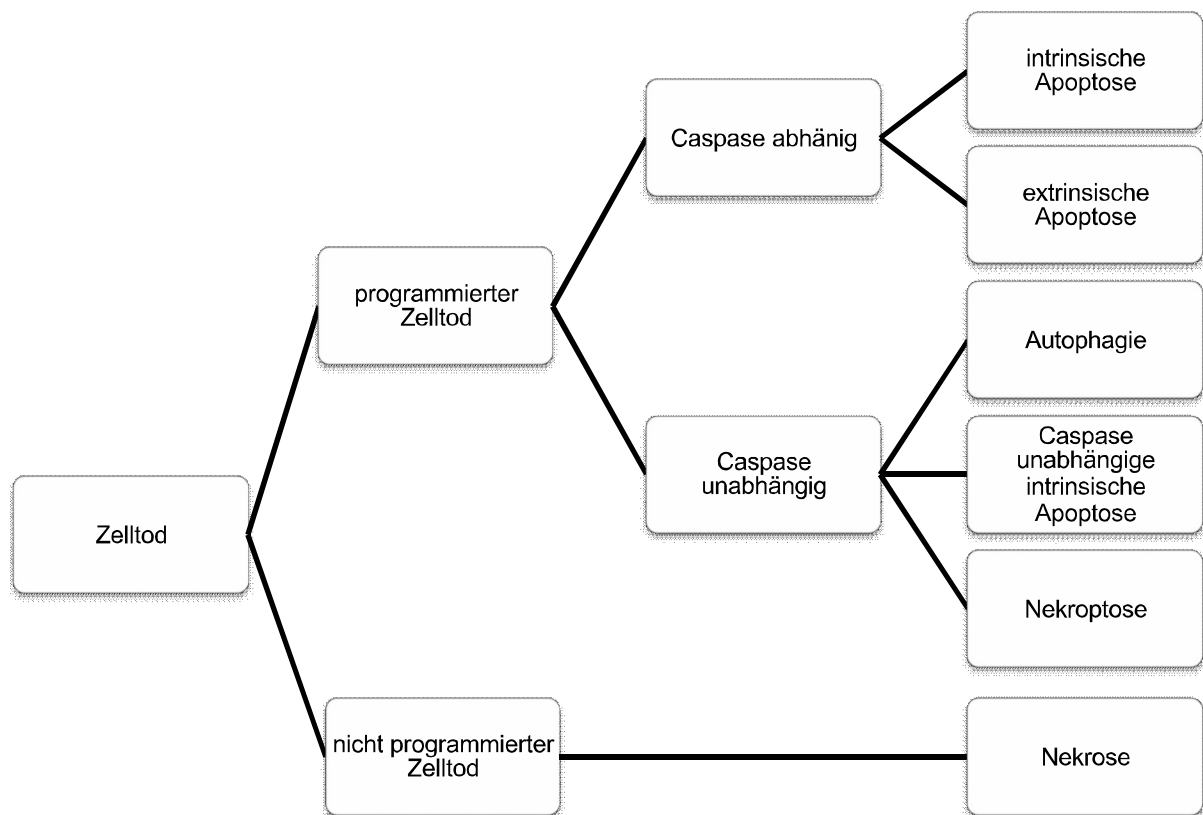


Abb. 4-3: Varianten des Zelltods

Auch die Nekroptose muss für die vorliegenden Versuche in Betracht gezogen werden. Diese Form der regulierten Nekrose wird über die Todesrezeptoren (v.a. TNF) der Zellmembran ausgelöst und steht in enger Verbindung zur Apoptose. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Caspase-8. Wird diese aktiviert geht die Zelle in Apoptose. Bei Inhibition führt die Zelle die Nekroptose aus [Berghe, 2014].

In Abbildung 4-4 sind schematisch die positiven und nicht nachweisbaren (n.n.) Zell-todmarker nach Ozonexposition zusammengefasst.

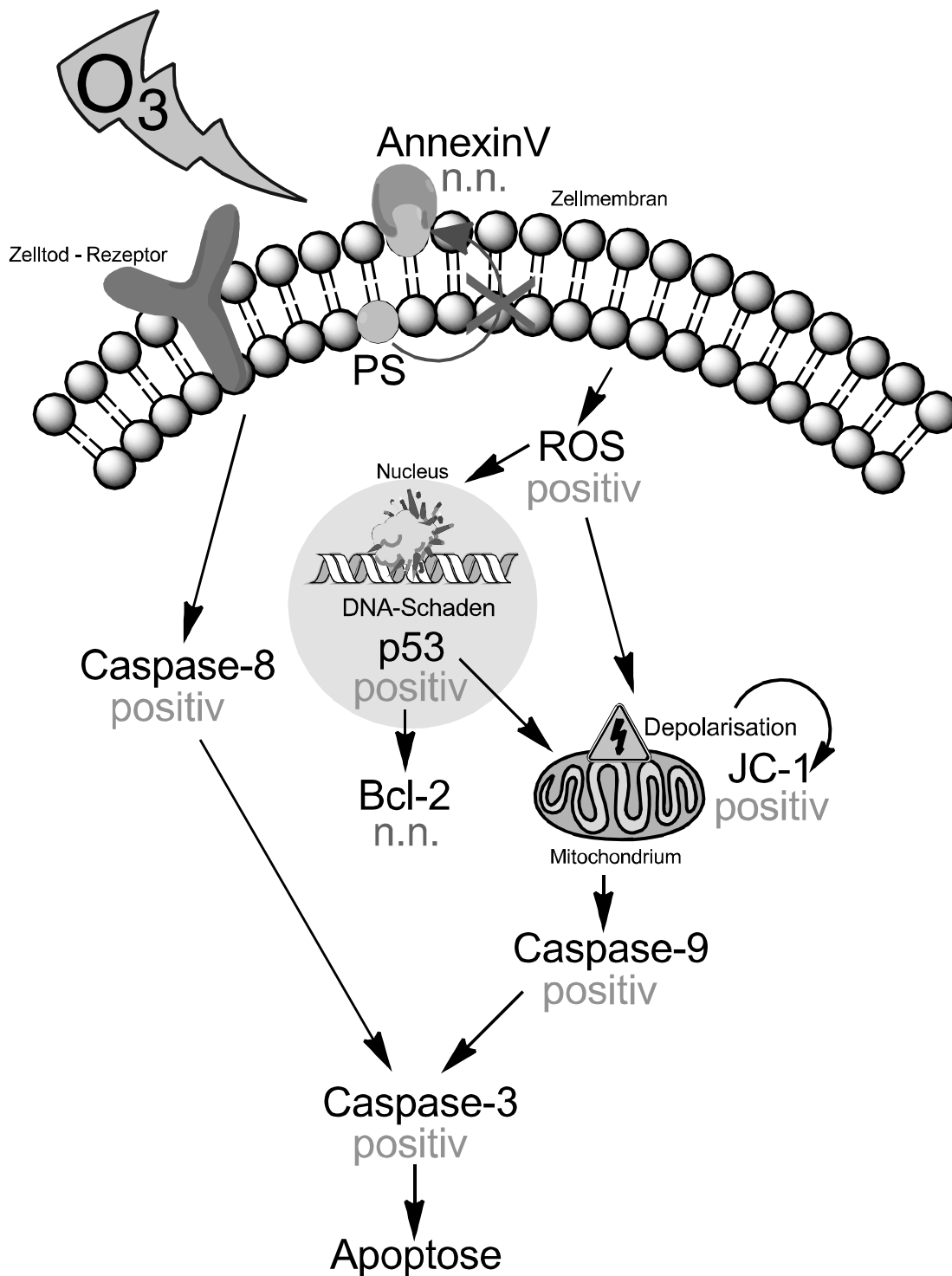


Abb. 4-4: Nachweis von Zelltodmarkern nach Ozonexposition: Neben den Caspasen war auch der Nachweis von JC-1 und ROS, positiv. Nicht nachweisbar (n.n.) waren AnnexinV und Bcl-2.

Diskussion

Die Caspase- und p53-Ergebnisse weisen darauf hin, dass A549 und L929 Zellen auch nach einer Ozonexposition von 0,2% w/w (= 1336 ppm) den programmierten Zelltod ausführten.

Die Initiatorcaspase-9 zeigte in den A549-Zellen eine stärkere Aktivierung im Vergleich zur Initiatorcaspase-8 und zur Effektorcaspase-3. Die murine L929 Zelllinie wies eine annähernd gleiche Aktivierung aller Caspasen auf.

Dies steht im Widerspruch zu dem in der nachfolgenden Literatur beschriebenen Caspase-unabhängigen Zelltod nach Ozonexposition. In alveolaren Epithelzellen Typ I und II war der Nachweis von Caspase-3 und -7 bei 0,4 ppm Ozon jeweils negativ [Kosmider, 2010]. Auch alveolare Rattenepithelzellen zeigten nach Ozonbehandlung von 0,1ppm keine Caspase-3 Aktivität [Wang, 2006]. Demgegenüber konnte an Mäusen gezeigt werden, dass eine Ozonkonzentration von 2,5 ppm zur Caspase-3 Aktivierung führt [Triantaphyllopoulos, 2011].

Der Vergleich der Literaturergebnisse mit unseren Daten spricht für eine konzentrationsabhängige Aktivierung der Caspasen nach Ozonexposition. An dieser Stelle sollte nochmals betont werden, dass zwischen der in der Literatur beschriebenen und der in diesen Versuchen verwendeten Ozonkonzentration ein Faktor von 1000 liegt.

Das Maximum von p53 wurde in beiden Zelllinien nach 4h erreicht. Die Aktivierung der Apoptose über die Mitochondrien und die Zellmembran fand also deutlich schneller statt als über den Zellkern. Die Effekte einer hohen Ozonkonzentration auf die p53-Kinetik wurden bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Die p53-Kinetik unserer Zellen stimmte überein mit der Kinetik von MOLT-4 Zellen [Nakano, 2007] und der Kinetik von lymphoblastischen Zelllinien [Wittlinger, 2007] nach Röntgenbestrahlung. In beiden Fundstellen sowie in unseren Versuchen stieg die p53-Konzentration innerhalb von 3 – 6 Stunden an und nahm anschließend innerhalb von 24 Stunden wieder ab.

p53 wird unter pathologischen Bedingungen hochreguliert. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist die p53-Konzentration niedrig und erlaubt die Bildung antioxidativer und anti-apoptotischer Genprodukte [Sablina, 2005]. Dies passt zu unseren Versuchen, in denen das anti-apoptotische Genprodukt Bcl-2 nach Ozonexposition nicht erhöht war.

Außer durch Apoptose kann die Zelle auch durch Nekrose untergehen. Für eine Nekrose spricht die Zunahme des Zellvolumens [Barros, 2001]. Die morphologischen Aufnahmen nach Ozonexposition zeigten hingegen keine vergrößerten A549 oder L929 Zellen.

Das fehlende Annexin V Signal kann zum einen durch einen Schaden der Zellmembran interpretiert werden. Eine Translokation der PS-Köpfe von intra- nach extrazellulär fand nicht mehr statt. Bei Nekrose und Nekroptose ist dies der Fall [Voigt, 2014]. Zum anderen könnte eine (oxidative) Veränderung der PS-Köpfe die Ursache sein, dass Annexin V nicht mehr an diese binden kann. Dieses Phänomen wurde bisher nicht beschrieben.

Ein intrazellulärer Anstieg von ROS steht in L929 Zellen in Zusammenhang mit Nekroptose [Christofferson, 2010]. Eine Apoptose kann deswegen aber trotzdem nicht ausgeschlossen werden. Rein nekrotische und nekroptotische Signale wurden in den vorliegenden Versuchen nicht identifiziert.

Folglich bewirkte Ozon zunächst gleichermaßen einen Membran- und Mitochondrienschaden in den A549- und L929-Zellen und endete in einer Caspase-abhängigen Apoptose. Zeitversetzt kam es zu einer p53-Erhöhung in den Zellen, was ebenfalls zur Apoptose führte.

4.6 Minderung von Zellschäden nach Hochdosis-Ozonexposition

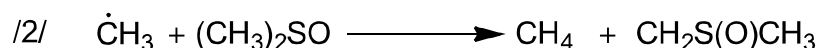
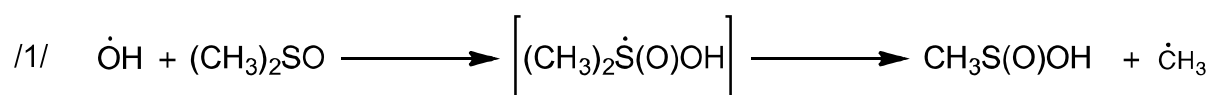
Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war die Möglichkeit einer medikamentösen Prophylaxe sowie therapeutischen Beeinflussung von Zellschäden nach Ozonexposition. Auf der Suche nach Antidota gegen die oxidierende Wirkung des Ozons fällt die Wahl leicht auf Antioxidanzien. Neben den Enzymen wie SOD und GPX kommen nicht-enzymatische Substanzen wie Karotinoide, NAC oder DMSO in Frage. Für unsere Versuche war DMSO von Vorteil, da es bei 37°C einen flüssigen Aggregatzustand hat, gut wasserlöslich ist und sich mit der verwendeten Pufferlösung HBSS mischen ließ. Die Lipophilie sorgt außerdem für eine leichte Permeation durch biologische Grenzflächen [Szmant, 1975].

Diskussion

Unsere Ergebnisse zeigen eindeutig, dass durch die Zugabe von 1% v/v DMSO der oxidative Einfluss von Ozon auf die Zellen gemindert wurde. Zum einen konnte die Bildung von ROS signifikant reduziert werden, was den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials verhinderte. Zum anderen hatte DMSO auch Einfluss auf die Apoptose, da die Zahl der Caspase-3-positiven Zellen sank. In ähnlicher Weise konnte dies an A549 Zellen gezeigt werden, die mit proinflammatorischen Cytokinen IL-1 β , TNF- α und IFN- γ inkubiert wurden [Muroya, 2012]. Die Zugabe von 1% v/v DMSO reduzierte hier signifikant die Zahl Caspase-positiver Zellen und die LDH-Konzentration in den A549 Zellen. In Zellhomogenaten der Ratte konnte nach Inkubation mit Eisenchlorid und Wasserstoffperoxid eine Verminderung der Hydroxid- und Lipidperoxidradikale nach DMSO Zugabe gesehen werden [Sanmartin-Suarez, 2011].

DMSO wirkt als Radikalfänger [Bektaşoğlu, 2006], was zu unseren Ergebnissen passt, wo die Zahl der ROS-positiven Zellen nach DMSO Zugabe sank.

Wirft man einen Blick auf den Reaktionsmechanismus von ROS bzw. Radikalen mit DMSO, bietet das Reaktionsschema von Herscu-Kluska et al. [Herscu-Kluska, 2008] eine mögliche Erklärung:



In wässrigen Lösungen entstehen zunächst Methylradikale /1/, die wiederum mit DMSO reagieren /2/. Daneben können auch die in der Lösung vorhandenen Carbonyl- und Hydroperoxylradikale und das Hyperoxid-Anion mit DMSO reagieren. An dieser Stelle wäre ein Nachweis der entstehenden Produkte aus der Reaktion von Ozon mit DMSO mittels Gaschromatographie von Interesse.

5. Fazit

Die in der Literatur beschriebenen In-vitro- und In-vivo-Versuche verwendeten hauptsächlich die in der Umwelt vorkommenden Ozonkonzentrationen. Deutlich davon abzugrenzen sind die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen. Wie eingangs erwähnt werden solche Konzentrationen bei der Ab- und Badewasserreinigung und Trinkwasserdesinfektion um den Faktor 10000 überschritten. Außerdem wird Ozon zur Desinfektion von Räumen eingesetzt. Die in der Einleitung genannten Ozonunfälle zeigen deutlich auf, dass in diesem Bereich exponierte Arbeiter geschützt werden müssen, da Ozon bei diesen Konzentrationen in kürzester Zeit massive Schäden bewirkt und unter Umständen rasch zum Tode führt. Bei diesen extremen Konzentrationen sind In-vivo Versuche definitiv nicht durchführbar, was den Einsatz von Expositionsapparaturen erfordert. Um eine Einschätzung der zellulären Reaktionen nach massiver Ozonintoxikation vorzunehmen, zeigten die vorliegenden Versuche wichtige zelluläre Antworten auf, die nach Hochdosis-Ozonexposition ablaufen.

Die untersuchten Endpunkte wiesen in unterschiedlichen Zelllinien vergleichbare Ergebnisse auf, was zu der Annahme berechtigt, dass Hochdosis-Expositionen keine grundsätzlich anderen Reaktionsmuster provozieren als eine Ozon-Exposition bei niedriger Konzentration. Das galt auch für die Zelltodmarker. Obwohl unterschiedlichen Ursprungs, zeigten A549 und L929 Zellen ähnliche Reaktionen in allen Versuchen. Ozon induzierte vor allem apoptotische Signale in den Zellen. Nekrose und Nekroptose schienen unter diesen Bedingungen eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die starke Oxidationskraft von Ozon könnte erklären, dass einzelne Ergebnisse wie z.B. das fehlende Annexin V Signal vom typischen Reaktionsmuster abwichen.

Für das Auftreten von Ozon als Oxidans sprechen die Befunde einer Vorbehandlung der Zellen mit DMSO. Hier zeigte sich in-vitro auch nach Hochdosis Ozon eine schützende Wirkung. Dieser Aspekt sollte in weitergehenden Experimenten mit der vorliegenden Expositionsapparatur verfolgt werden.

Anhang

1. Berechnungen

Ausführliche Berechnung zu Abschnitt 3.1.1: Ozonlöslichkeit für die vorliegende Expositionsapparatur

$$/1/ \quad H_{px} = 3,84 \times 10^7 [\text{OH}^-]^{0,035} \exp(-2428/T) \quad [\text{Roth, 1981}]$$

Hierbei wird die $[\text{OH}^-]$ = Hydroxidionenkonzentration in $\frac{\text{mol}}{\text{l}}$ angegeben und ist in einem Bereich von $1 < \text{pH} < 10$ gültig. Die Temperatur T wird in Kelvin angegeben und ist in einem Bereich von $277\text{K} < T < 333\text{K}$ gültig.

Für das vorliegende System ist $[\text{OH}^-] = 10^{-7}$ und $T = 37^\circ\text{C} = 310\text{K}$ und liefert in [1] eingesetzt folgenden Wert:

$$/2/ \quad H_{px} = 8666,1 \frac{\text{atm}}{\text{Mol Fr}}$$

Zur weiteren Berechnung für die in diesem System gelöste Ozonkonzentration sind weitere Formeln nötig:

$$/3/ \quad H_{pc} = 1,83 \cdot 10^{-3} H_{px} \quad \Rightarrow \quad H_{pc} = 0,156 \frac{\text{atm m}^3}{\text{mol}} \quad [\text{EPA, 2013}]$$

$$/4/ \quad H_{cp} = \frac{1}{H_{pc}} \quad \Rightarrow \quad H_{cp} = 6,4 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l atm}} \quad [\text{Sander, 2014}]$$

/5/ Berechnung der Stoffmenge $n(\text{O}_3)$:

$$0,100\% \text{ w/w } (\text{O}_3) = 668\text{ppm} = 1,43 \frac{\text{g } (\text{O}_3)}{\text{m}^3 (\text{O}_2)} = 1,43 \frac{\text{mg}}{\text{l}}$$

Gasraum pro Zellkulturflasche = ca. 55ml

$$\Rightarrow 0,07865 \frac{\text{mg } (\text{O}_3)}{55\text{ml } (\text{O}_2)}$$

$$\Rightarrow n(\text{O}_3) = \frac{m}{M} = \frac{0,07865\text{mg}}{48\text{g/mol}} = 1,64\mu\text{mol}$$

/6/ Berechnung der Stoffmenge $n(\text{O}_2)$:

Anhang

$$\text{Dichte O}_2 = 1,429 \text{ kg/m}^3 \Rightarrow 1429 \text{ g/m}^3 = 1429 \text{ mg/l}$$

$$\text{Gasraum pro Zellkulturflasche} = \text{ca. } 55 \text{ ml}$$

$$\Rightarrow 78,6 \text{ mg} \frac{\text{mg (2)}}{55 \text{ ml (O}_2\text{)}}$$

$$\Rightarrow n(\text{O}_2) = \frac{m}{M} = \frac{78,6 \text{ mg}}{32 \text{ g/mol}} = 2,456 \text{ mmol}$$

$$/7/ \quad \chi = \frac{n(\text{O}_3)}{n(\text{O}_2) + n(\text{O}_3)} \quad \Rightarrow \quad \chi = 6,83 \cdot 10^{-4}$$

$$/8/ \quad \text{Partialdruck} = 1 \text{ atm} \cdot \chi = 1 \text{ atm} \cdot 6,83 \cdot 10^{-4}$$

$$/9/ \quad C_{\text{aq}}(\text{O}_3) = H_{\text{cp}} \cdot \text{Partialdruck} = 6,4 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l atm}} \cdot 1 \text{ atm} \cdot 6,83 \cdot 10^{-4} =$$

$$= 4,3712 \cdot 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{l}} = 4,3712 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{m}^3} = 0,2 \frac{\text{g}}{\text{m}^3}$$

2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Industrielle Anwendungen von Ozon [Rice, 1999]	1
Tabelle 1-2: Ozon in der Umwelt in aufsteigender Konzentration.....	11
Tabelle 2-1: Verdünnungsreihe zur Erstellung der Eichkurve	25
Tabelle 2-2: Pipettierschema für die photometrische Glutathionbestimmung.....	25
Tabelle 3-1: Vergleich der Ozonkonzentrationen	34
Tabelle 3-2: Theoretische Absorption	35
Tabelle 3-3: Vergleich von berechneter und gemessener Löslichkeit.....	36
Tabelle 4-1: Befunde zur Ozon-Toxizität und zur DMSO-Wirkung.....	71

Einzelwerte zu Tabelle 3-3: Vergleich von berechneter und gemessener Löslichkeit

Zeit [min]	Extinktion 610 nm	Mittelwert	Standardabweichung
0	2,612 2,891 2,553 2,919 2,799	2,755	0,165
1	2,601 2,596 2,711 2,608 2,593	2,622	0,05
2	2,469 2,351 2,408 2,513 2,478	2,444	0,064
3	1,951 1,843 1,976 1,791 1,997	1,912	0,090

Anhang

5	1,412 1,402 1,384 1,346 1,461	1,401	0,042
10	0,411 0,395 0,322 0,521 0,218	0,373	0,112

3. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Mesomere Grenzstrukturen des Ozonmoleküls.....	3
Abb. 1-2: Löslichkeit von Ozon gegenüber Sauerstoff in Wasser	4
Abb. 1-3: Ozonimmissionskonzentration im Bundesland Bayern.....	5
Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Ozonolyse	6
Abb. 1-5: Zelluläre Angriffspunkte von Ozon.	9
Abb. 2-1: Schematischer Aufbau der Expositionsanlage.....	20
Abb. 2-2: Auslenkbewegung der Expositions-kammer	21
Abb. 2-3: Reaktionsmechanismus von Indigokarmin mit Ozon	22
Abb. 2-4: Farbgebende Reaktion des XTT-Tests	23
Abb. 2-5: Fluoreszenzänderung des Farbstoffs JC-1	29
Abb. 3-1: Farbreaktion von Indigokarmin mit Ozon	36
Abb. 3-2: Holografische Aufnahme von suspendierten Kontroll- und Ozon- exponierten A549 Zellen.....	38
Abb. 3-3: Holografische Aufnahme von suspendierten Kontroll- und Ozon- exponierten L929 Zellen	39

Anhang

Abb. 3-4: Holografische Aufnahme von adhärenenten Kontroll- und Ozon-exponierten A549 Zellen	41
Abb. 3-5: Holografische Aufnahme von adhärenenten Kontroll- und Ozon-exponierten L929 Zellen.....	42
Abb. 3-6: Vergleich der Membran- und metabolischen Toxizität von A549 Zellen.....	45
Abb. 3-7: Vergleich der Membran- und metabolischen Toxizität von L929 Zellen.....	46
Abb. 3-8: Fluoreszenzmessung von Caspase-8.....	47
Abb. 3-9: Fluoreszenzmessung von Caspase-8.....	48
Abb. 3-10: Caspase-8 Aktivierung nach Ozonbehandlung.....	49
Abb. 3-11: Bildung von ROS nach Ozon- und H ₂ O ₂ -Exposition	51
Abb. 3-12: Bildung von ROS nach Ozon- und H ₂ O ₂ -Exposition	52
Abb. 3-13: Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials	54
Abb. 3-14: Konzentrationsabhängiger Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials	55
Abb. 3-15: Zeitlicher Verlauf der p53 Konzentration nach Ozonexposition	56
Abb. 3-16: Fluoreszenzmessung von Caspase-9.....	57
Abb. 3-17: Fluoreszenzmessung von Caspase-9.....	58
Abb. 3-18: Caspase-9 Aktivierung nach Ozonbehandlung.....	59
Abb. 3-19: Fluoreszenzmessung von Caspase-3.....	60
Abb. 3-20: Fluoreszenzmessung von Caspase-3.....	61
Abb. 3-21: Caspase-3 Aktivierung nach Ozonbehandlung.....	62
Abb. 3-22: Einfluss von DMSO und DMSO ₂ auf die Proliferationsaktivität nach Ozonexposition.....	63
Abb. 3-23: Vergleich der Molekülstruktur von DMSO, DMSO ₂ und Harnstoff	64
Abb. 3-24: Einfluss von DMSO und Urea auf das mitochondriale Membranpotential während Ozonbehandlung	65

Anhang

Abb. 3-25: Einfluss von DMSO und DMSO ₂ auf das mitochondriale Membranpotential während der Ozonbehandlung.	66
Abb. 3-26: Bildung von ROS nach Ozon-Exposition unter Anwesenheit von DMSO	67
Abb. 3-27: Bildung von ROS nach DMSO/DMSO ₂ Zugabe während Ozon-Exposition	68
Abb. 3-28: Caspase-3 Aktivierung nach DMSO/DMSO ₂ Zugabe während Ozonbehandlung	69
Abb. 4-1 Folgeprodukte von Glucose nach Reaktion mit Ozon.....	77
Abb. 4-2 Lipidperoxidradikal als toxisches Abbauprodukt.	77
Abb. 4-3: Varianten des Zelltods.....	79
Abb. 4-4: Nachweis von Zelltodmarkern nach Ozonexposition	80

Einzelwerte zu Abbildung 3-6: Vergleich der Membran- und metabolischen Toxizität von A549 Zellen

c(O ₃) [%w/w]	Vitalität [%]	MW ± SD [%]	GSX [%]	MW ± SD [%]	XTT [%]	MW ± SD [%]
0,0	95 98 91 96	95 ± 3	100 100 100 100	100 ± 0	100 100 100 100	100 ± 0
0,1	87 85 90 88	88 ± 2	69 73 69 71	71 ± 2	57 49 60 54	55 ± 4
0,3	59 64 61 60	61 ± 2	54 58 63 57	58 ± 3	44 36 40 42	41 ± 3
0,5	41 48 44 42	44 ± 3	58 40 53 48	50 ± 7	28 17 30 23	25 ± 5

Anhang

0,7	31	27 ± 3	45	40 ± 4	16	16 ± 3
	24		39		12	
	27		35		21	
	26		42		15	

Einzelwerte zu Abbildung 3-7: Vergleich der Membran- und metabolischen Toxizität von L929 Zellen

c(O ₃) [%w/w]	Vitalität [%]	MW ± SD [%]	GSX [%]	MW ± SD [%]	XTT [%]	MW ± SD [%]
0,0	93	94 ± 1	100	100 ± 0	100	100 ± 0
	95		100		100	
	94		100		100	
	93		100		100	
0,1	81	86 ± 4	86	81 ± 6	51	59 ± 7
	91		85		69	
	86		70		56	
	87		82		58	
0,3	59	63 ± 3	78	71 ± 4	28	30 ± 2
	62		71		29	
	64		66		30	
	66		69		33	
0,5	41	43 ± 1	48	49 ± 2	21	19 ± 3
	45		46		15	
	43		52		18	
	42		49		22	
0,7	29	32 ± 2	40	36 ± 4	11	15 ± 3
	35		35		19	
	33		29		15	
	30		38		16	

Einzelwerte zu Abbildung 3-10: Caspase-8 Aktivierung nach Ozonbehandlung

Zellfraktion	Caspase-8 positiv [%]	MW ± SD [%]
Kontrolle A549	9,92	8,295 ± 4,138
	2,92	
	7,64	

Anhang

	12,70	
Probe A549	95,2 64,4 70,1 74,3	76,0 ± 13,43
Kontrolle L929	10,0 7,26 10,80 6,14	8,550 ± 2,209
Probe L929	77,6 77,9 82,2 78,4	79,03 ± 2,142

Anhang

Einzelwerte zu Abbildung 3-12: Bildung von ROS nach Ozon- und H₂O₂-Exposition

Zellfraktion	ROS positiv [%]	MW ± SD [%]
Kontrolle A549	1,30 1,16 2,46	1,640 ± 0,7136
O₃ A549	97,3 76,7 88,3 97,5 55,4	83,04 ± 17,64
H₂O₂ A549	98,9 94,6 97,9 96,5 75,2	92,62 ± 9,871
Kontrolle L929	1,02 0,34 0,24 1,26 0,24	0,620 ± 0,4839
O₃ L929	99,3 60,5 76,2 73,9 93,9	80,76 ± 15,77
H₂O₂ L929	99,1 95,2 94,1 96,2 95,2	95,96 ± 1,906

Anhang

Einzelwerte zu **Abbildung 3-14**: Konzentrationsabhängiger Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials

c(O ₃) [%w/w]	A549 JC1 positiv [%]	A549 MW ± SD [%]	L929 JC1 positiv [%]	L929 MW ± SD [%]
0,0	10,0 7,83 9,84	9,223 ± 1,209	9,88 7,96 10,7	9,513 ± 1,406
0,03	14,9 14,4 14,5	14,6 ± 0,265	17,4 13,2 19,2	16,6 ± 3,079
0,1	23,4 24,3 25,9	24,533 ± 1,266	19,3 21,0 20,3	20,2 ± 0,854
0,15	42,2 56,7 44,0	47,633 ± 7,903	32,6 32,9 35,0	33,5 ± 1,308
0,2	67,4 47,8 55,9	57,033 ± 9,849	58,8 53,8 47,8	53,467 ± 5,51

Einzelwerte zu **Abbildung 3-15**: Zeitlicher Verlauf der p53 Konzentration nach Ozoneexposition in **A549** Zellen

Nachinkubationszeit [h]	Kontrolle [U/mL]	MW ± SD [U/mL]	O ₃ [U/mL]	MW ± SD [U/mL]	H ₂ O ₂ [U/mL]	MW ± SD [U/mL]
0	28,3 27,6 29,9 30,8	29,15 ± 1,462	35,7 46,6 43,0 53,4	44,675 ± 7,375	43,4 41,4 37,1 60,2	45,525 ± 10,13
4	32,1 28,4 24,4 32,1	29,25 ± 3,674	51,6 55,1 50,7 48,4	51,45 ± 2,781	46,2 55,9 43,0 63,3	52,1 ± 9,265
24	31,2	30,0 ± 3,806	34,7	34,725 ± 3,704	39,3	37,7 ± 5,058

Anhang

	29,3		38,9		42,1	
	25,2		29,9		30,6	
	34,3		35,4		34,8	

Einzelwerte zu Abbildung 3-15: Zeitlicher Verlauf der p53 Konzentration nach Ozo-
nexposition in L929 Zellen

Nachin- kubationszeit [h]	Kontrolle [U/mL]	MW \pm SD [U/mL]	O ₃ [U/mL]	MW \pm SD [U/mL]	H ₂ O ₂ [U/mL]	MW \pm SD [U/mL]
0	24,0 26,2 30,8 24,9	26,475 \pm 3,021	27,2 33,0 32,1 28,0	30,075 \pm 2,9	38,5 43,0 35,3 29,0	36,45 \pm 5,886
4	31,7 25,6 27,1 28,2	28,15 \pm 2,596	42,5 39,8 40,2 46,6	42,275 \pm 3,119	29,4 35,4 36,2 42,1	35,775 \pm 5,195
24	31,2 34,3 22,9 29,8	29,55 \pm 4,816	31,4 35,2 29,2 27,3	30,775 \pm 3,393	38,5 31,4 29,3 37,4	34,15 \pm 4,493

Einzelwerte zu Abbildung 3-18: Caspase-9 Aktivierung nach Ozonbehandlung

Zellfraktion	Caspase-9 positiv [%]	MW \pm SD [%]
Kontrolle A549	8,14 4,22 12,70 14,70	9,940 \pm 4,699
Probe A549	94,5 91,6 99,2 89,0	93,58 \pm 4,371
Kontrolle L929	9,84	13,99 \pm 3,256

Anhang

	13,40 12,6 17,7	
Probe L929	85,5 76,1 74,8 77,3	78,43 ± 4,826

Einzelwerte zu Abbildung 3-21: Caspase-3 Aktivierung nach Ozonbehandlung

Zellfraktion	Caspase-3 positiv [%]	MW ± SD [%]
Kontrolle A549	10,30 9,48 10,50 9,78	10,02 ± 0,4683
Probe A549	67,9 71,2 83,4 76,1	74,65 ± 6,736
Kontrolle L929	10,20 2,70 8,56 9,68	7,785 ± 3,458
Probe L929	69,3 68,0 98,3 93,7	82,33 ± 15,91

Anhang

Einzelwerte zu Abbildung 3-24: Einfluss von DMSO und Urea auf das mitochondriale Membranpotential während Ozonbehandlung in **A549** Zellen

Zellfraktion	JC-1 positiv [%]	MW \pm SD [%]
Kontrolle	10,0 12,6 7,38 9,84 9,84	9,932 \pm 1,847
O₃	47,7 57,1 69,9 57,7 39,0 37,4	51,47 \pm 12,47
O₃ + 1%DMSO	20,5 24,1 13,9 26,6 25,8 21,9	22,13 \pm 4,643
O₃ + 1%Urea	67,4 47,8 43,9 47,2 55,9	52,44 \pm 9,456
H₂O₂	37,3 51,7 38,5 36,2	40,93 \pm 7,244

Anhang

Einzelwerte zu Abbildung 3-24: Einfluss von DMSO und Urea auf das mitochondriale Membranpotential während Ozonbehandlung in **L929** Zellen

Zellfraktion	JC-1 positiv [%]	MW \pm SD [%]
Kontrolle	9,66 6,24 13,2 5,8 4,34	7,848 \pm 3,571
O₃	63,2 63,5 84,9 70,8 68,8 58,8 53,8	66,26 \pm 10,02
O₃ + 1%DMSO	31,6 37,0 23,2 34,6 51,1	35,5 \pm 10,16
O₃ + 1%Urea	58,8 53,8 42,4 47,8	50,7 \pm 7,13
H₂O₂	34,7 34,0 31,3 34,0	33,5 \pm 1,503

Anhang

Einzelwerte zu Abbildung 3-25: Einfluss von DMSO und DMSO₂ auf das mitochondriale Membranpotential während der Ozonbehandlung in **A549** Zellen

Zellfraktion	JC-1 positiv [%]	MW ± SD [%]
Kontrolle	10,0 12,6 7,38 9,84 9,84	9,932 ± 1,847
O₃	47,7 57,1 69,9 57,7 39,0 37,4	51,47 ± 12,47
O₃ + 1%DMSO	20,5 24,1 13,9 26,6 25,8 21,9	22,13 ± 4,643
O₃ + 1%DMSO₂	73,2 77,2 39,4 51,3 34,3	55,08 ± 19,43

Anhang

Einzelwerte zu Abbildung 3-25: Einfluss von DMSO und DMSO₂ auf das mitochondriale Membranpotential während der Ozonbehandlung in **L929** Zellen

Zellfraktion	JC-1 positiv [%]	MW ± SD [%]
Kontrolle	9,66 6,24 13,2 5,8 4,34	7,848 ± 3,571
O₃	63,2 63,5 84,9 70,8 68,8 58,8 53,8	66,20 ± 9,896
O₃ + 1%DMSO	31,6 37,0 23,2 34,6 51,1	35,5 ± 10,16
O₃ + 1%DMSO₂	46,0 51,9 88,4 67,2 60,8	62,86 ± 16,43

Anhang

Einzelwerte zu Abbildung 3-27: Bildung von ROS nach DMSO/DMSO₂ Zugabe während Ozon-Exposition in **A549** Zellen

Zellfraktion	ROS positiv [%]	MW ± SD [%]
Kontrolle	1,3 1,16 2,46	1,64 ± 0,7136
O₃	97,3 76,7 88,3 97,5 55,4	83,04 ± 17,64
O₃ + 1%DMSO	44,5 33,6 26,8 69,1 21,7	39,14 ± 18,8
O₃ + 1%DMSO₂	96,3 73,9 78,2 85,2 62,6	79,24 ± 12,58

Anhang

Einzelwerte zu Abbildung 3-27: Bildung von ROS nach DMSO/DMSO₂ Zugabe während Ozon-Exposition in **L929** Zellen

Zellfraktion	ROS positiv [%]	MW ± SD [%]
Kontrolle	1,02 0,34 0,24 1,26 0,24	0,62 ± 0,4839
O₃	99,3 60,5 76,2 73,9 93,9	80,76 ± 15,77
O₃ + 1%DMSO	72,5 52,0 40,9 57,6 16,5	47,9 ± 20,92
O₃ + 1%DMSO₂	91,6 88,4 88,4 76,1 72,1	83,32 ± 8,634

Anhang

Einzelwerte zu Abbildung 3-28: Caspase-3 Aktivierung nach DMSO/DMSO₂ Zugabe während Ozonbehandlung in **A549** Zellen

Zellfraktion	Caspase-3 positiv [%]	MW ± SD [%]
Kontrolle	10,3 9,48 10,5 9,78	10,02 ± 0,4683
O₃	67,9 71,2 83,4 76,1 83,9 62,2 77,0	74,53 ± 7,980
O₃ + 1%DMSO	48,0 67,5 43,3 58,1 56,0	54,58 ± 9,379
O₃ + 1%DMSO₂	58,0 78,8 66,6 72,4 67,2	68,6 ± 7,694

Einzelwerte zu Abbildung 3-28: Caspase-3 Aktivierung nach DMSO/DMSO₂ Zugabe während Ozonbehandlung in **L929** Zellen

Zellfraktion	Caspase-3 positiv [%]	MW ± SD [%]
Kontrolle	10,2 2,7 8,56 9,68	7,785 ± 3,458
O₃	69,3 68,0 98,3 93,7 85,1 76,4	81,8 ± 12,65
O₃ + 1%DMSO	38,9 73,7 65,4 45,4 66,0	57,88 ± 14,91
O₃ + 1%DMSO₂	58,8 73,8 80,0 65,4 85,9	72,78 ± 10,9

Literaturverzeichnis

- Alm, K., El-Schich, Z., Falck Miniotis, M. *et al*: **Cells and holograms: holograms and digital holographic microscopy as a tool to study the morphology of living cells.** Kapitel 14, *InTech* 2013.
- Aufderheide, M., Halter, B., Mohle, N. *et al*: **The CULTEX RFS: a comprehensive technical approach for the in vitro exposure of airway epithelial cells to the particulate matter at the air-liquid interface.** *Biomed Res Int* 2013, **2013**:734137.
- Azad, N., Rojanasakul, Y., Vallyathan, V.: **Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species.** *J Toxicol Environ Health* 2008, **11**(1):1-15.
- Bader, H.: **Determination of ozone in water by the indigo method: a submitted standard method.** *Ozone: Science & Engineering: The Journal of the International Ozone Association* 1982.
- Barros, L.F., Hermosilla, T., Castro, J.: **Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis.** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001, **130**(3):401-409.
- Bayr, H.: **Reactive oxygen species.** *Crit Care Med* 2005, **33**(12):S498-S501.
- Bektaşoğlu, B., Celik, S. E., Özyürek, M. *et al*: **Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using a modified CUPRAC method.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **345**(3):1194-1200.
- Berghe, T. Vanden, Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S. *et al*: **Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014, **15**(2):135-147.
- Bunke, D., Umwelt-Bundesamt: **Bewertung von Stoffeigenschaften.** 2012.
- Cain, W.S., Schmidt, R., Wolkoff, P.: **Olfactory detection of ozone and d-limonene: reactants in indoor spaces.** *Indoor Air* 2007, **17**(5):337-347.
- Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S. A. *et al*: **Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis.** *J Immunol* 1996, **157**(2):512-521.
- Chen, C., Arjomandi, M., Balmes, J. *et al*: **Effects of chronic and acute ozone exposure on lipid peroxidation and antioxidant capacity in healthy young adults.** *Environ Health Perspect* 2007:1732-1737.
- Cheng, T.-J., Kao, H.-P., Chan, C.-C. *et al*: **Effects of ozone on DNA single-strand breaks and 8-oxoguanine formation in A549 cells.** *Environ Res* 2003, **93**(3):279-284.
- Chiu, T.-L., Su, C.-C.: **Tanshinone IIA induces apoptosis in human lung cancer A549 cells through the induction of reactive oxygen species and decreasing the mitochondrial membrane potential.** *Int J Mol Med* 2010, **25**(2):231.

- Cho, H. Y., Morgan, D. L., Bauer, A. K. *et al*: **Signal transduction pathways of tumor necrosis factor-mediated lung injury induced by ozone in mice.** *Am J Respir Crit Care Med* 2007, **175**(8):829-839.
- Christofferson, D. E. , Yuan, J.: **Necroptosis as an alternative form of programmed cell death.** *Curr Opin Cell Biol* 2010, **22**(2):263-268.
- Criegee, R.: **Course of ozonization of unsaturated compounds.** *Rec Chem Progr* 1957, **18**:111-120.
- Dandrea, T., Hellmold, H., Jonsson, C. *et al*: **The transcriptosomal response of human A549 lung cells to a hydrogen peroxide-generating system: relationship to DNA damage, cell cycle arrest, and caspase activation.** *Free Radic Biol Med* 2004, **36**(7):881-896.
- DFG, Deutsche-Forschungsgemeinschaft: **MAK- und BAT-Werte-Liste 2013 Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe.** 2013.
- DIMDI: **ICD-10-WHO Version 2013.**
[<https://http://www.dimdi.de/static/de/klassi/icd-10-who/kodesuche/onlinefassungen/htmlamtl2013/block-t51-t65.htm>] 08.07.2015.
- EPA, US, Office of Water: **The history of drinking water treatment.** 2000.
- EPA, US: **EPA On-line Tools for Site Assessment Calculation.**
[<http://www.epa.gov/athens/learn2model/part-two/onsite/henryslaw.html>] 01.12.2014.
- Eriksson, M., Department of Chemistry Royal Institute of Technology Stockholm, Sweden: **Ozone chemistry in aqueous solution: ozone decomposition and stabilisation.** 2005.
- Europäisches Parlament, Rat der Europäischen Union: **Richtlinie 2008/50/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 21. Mai 2008 über Luftqualität und saubere Luft für Europa.** 2008.
- Eyer, P., Podhradský, D.: **Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent.** *Anal Biochem* 1986, **153**(1):57-66.
- Guicherit, R., Jelles, R., Lindqvist, F.: **Determination of the ozone concentration in outdoor air near Delft, The Netherlands.** *Environ Pollut* 1972, **3**(2):91-110.
- Hazucha, M. J., Folinsbee, L. J., Seal, E., Jr.: **Effects of steady-state and variable ozone concentration profiles on pulmonary function.** *Am Rev Respir Dis* 1992, **146**(6):1487-1493.
- Herscu-Kluska, R., Masarwa, A., Saphier, M. *et al*: **Mechanism of the reaction of radicals with peroxides and dimethyl sulfoxide in aqueous solution.** *Chem Eur J* 2008, **14**(19):5880-5889.
- Hu, S. C., Ben-Jebria, A., Ultman, J. S.: **Longitudinal distribution of ozone absorption in the lung: quiet respiration in healthy subjects.** *J Appl Physiol* 1992, **73**(4):1655-1661.
- Hughes, R. H.: **The Microwave Spectrum and Structure of Ozone.** *J Chem Phys* 1953, **21**(5):959-960.

- Jin, Y., Tanaka, A., Choi, A. M. K. *et al*: **Autophagic proteins: new facets of the oxygen paradox.** *Autophagy* 2012, **8**(3):426-428.
- Johnston, C. J.: **Inflammatory and antioxidant gene expression in C57BL/6J mice after lethal and sublethal ozone exposures.** *Exp Lung Res* 1999, **25**(1):81-97.
- Jörres, R. A., Holz, O., Zachgo, W. *et al*: **The effect of repeated ozone exposures on inflammatory markers in bronchoalveolar lavage fluid and mucosal biopsies.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000, **161**(6):1855-1861.
- Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D. *et al*: **Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage.** *Cancer Res* 1991, **51**(23 Part 1):6304-6311.
- Katre, A., Ballinger, C., Akhter, H. *et al*: **Increased transforming growth factor beta 1 expression mediates ozone-induced airway fibrosis in mice.** *Inhal Toxicol* 2011, **23**(8):486-494.
- Kettle, A. J., Clark, B. M., Winterbourn, C. C.: **Superoxide converts indigo carmine to isatin sulfonic acid: implications for the hypothesis that neutrophils produce ozone.** *J Biol Chem* 2004, **279**(18):18521-18525.
- Kim, K.-H., Kim, Y.-S., Kuh, S.-U. *et al*: **Time-and dose-dependent cytotoxicities of ioxitalamate and indigocarmine in human nucleus pulposus cells.** *Spine J* 2013, **13**(5):564-571.
- Kosmider, B., Loader, J. E., Murphy, R. C. *et al*: **Apoptosis induced by ozone and oxysterols in human alveolar epithelial cells.** *Free Radic Biol Med* 2010, **48**(11):1513-1524.
- Kraetzer, U.: **Wieder Ozon-Unfall im Stadtbad Schöneberg.** *Berliner Zeitung* 25.03.2000.
- Lane, J. D., Allan, V. J., Woodman, P. G.: **Active relocation of chromatin and endoplasmic reticulum into blebs in late apoptotic cells.** *J Cell Sci* 2005, **118**(17):4059-4071.
- Lauber, H.: **Ozon-Alarm im Laguna-Badeland.** *Badische Zeitung*, 04.03.2014.
- LfU-Bayern, Bayerisches Landesamt für Umwelt: **Bodennahes Ozon.** 2013.
- LfU-Bayern, Bayerisches Landesamt für Umwelt: **Fladis - Ozonkarten.**
[<http://www.lfu.bayern.de/luft/fladis/index.htm>] 19.05.2014.
- Lieber, M., Todaro, G., Smith, B. *et al*: **A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells.** *Int J Cancer* 1976, **17**(1):62-70.
- LUBW, Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg **Zusammensetzung der Luft.** 2013.
[<http://www.lubw.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/18340/>] 08.07.2015.
- Maddalena, R.L. , McKone, T.E., Destailats, H. *et al*, California Energy Commission, PIER Energy-Related Environmental Research: **Quantifying pollutant emissions from office equipment. A concern in Energy-Efficient Buildings.** 2011
- Marchi, S., Giorgi, C., Suski, J. M. *et al*: **Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging.** *J Signal Transduct* 2012, **2012**:329635.

- Markert, S.: **Zu viel Ozon in der Flugzeugkabine?** *Stuttgarter Nachrichten*, 19.07.2013.
- McDonnell, W. F., Kehrl, H. R., Abdul-Salaam, S. *et al*: **Respiratory response of humans exposed to low levels of ozone for 6.6 hours.** *Arch Environ Health* 1991, **46**(3):145-150.
- Meuli, K., Bundesamt für Umwelt, Thema Wasser, Schweiz: **Abwasserreinigung: Moderne Kläranlagen halten auch Spurenstoffe zurück.** 2014.
[<http://www.bafu.admin.ch/wasser/13390/14178/index.html?lang=de>] 25.07.2015.
- Miller, F. J., Overton, J. H., Jr., Jaskot, R. H. *et al*: **A model of the regional uptake of gaseous pollutants in the lung. I. The sensitivity of the uptake of ozone in the human lung to lower respiratory tract secretions and exercise.** *Toxicol Appl Pharmacol* 1985, **79**(1):11-27.
- Mückter, H., Zwing, M., Bader, S. *et al*: **A novel apparatus for the exposure of cultured cells to volatile agents.** *J Pharmacol Toxicol Methods* 1998, **40**(2):63-69.
- Muroya, M., Chang, K., Uchida, K. *et al*: **Analysis of cytotoxicity induced by proinflammatory cytokines in the human alveolar epithelial cell line A549.** *Biosci Trends* 2012, **6**(2):70-80.
- Nakano, H., Yonekawa, H., Shinohara, K.: **Threshold level of p53 required for the induction of apoptosis in X-irradiated MOLT-4 cells.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007, **68**(3):883-891.
- Ozone-Solutions: **Ozone Properties.** 2014
[<http://www.ozonesolutions.com/info/ozone-properties>] 22.05.2015.
- Ozone-Solutions: **Ozone use in Drinking Water.**
[<http://www.ozonesolutions.com/info/ozone-use-in-drinking-water>] 25.07.2015.
- Panas, A., Comouth, A., Saathoff, H. *et al*: **Silica nanoparticles are less toxic to human lung cells when deposited at the air–liquid interface compared to conventional submerged exposure.** *Beilstein J Nanotechnol* 2014, **5**(1):1590-1602.
- Pryor, W. A.: **How far does ozone penetrate into the pulmonary air/tissue boundary before it reacts?** *Free Radic Biol Med* 1992, **12**(1):83-88.
- Pryor, W. A., Das, B., Church, D. F.: **The ozonation of unsaturated fatty acids: aldehydes and hydrogen peroxide as products and possible mediators of ozone toxicity.** *Chem Res Toxicol* 1991, **4**(3):341-348.
- Pryor, W. A., Squadrito, G. L., Friedman, M.: **The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products.** *Free Radic Biol Med* 1995, **19**(6):935-941.
- Rach, J., Budde, J., Möhle, N. *et al*: **Direct exposure at the air–liquid interface: evaluation of an in vitro approach for simulating inhalation of airborne substances.** *J Appl Toxicol* 2014, **34**(5):506-515.
- Rice, R. G.: **Ozone in the United States of America--State-Of-The-Art.** *Ozone: Science & Engineering: The Journal of the International Ozone Association* 1999, **21**(2):99-118.

- Ritter, D., Knebel, J. W., Aufderheide, M.: **In vitro exposure of isolated cells to native gaseous compounds--development and validation of an optimized system for human lung cells.** *Exp Toxicol Pathol* 2001, **53**(5):373-386.
- Roth, J. A., Sullivan, D. E.: **Solubility of ozone in water.** *Ind Eng Chem Res* 1981, **20**(2):137-140.
- Rovida, C., Hartung, T.: **Re-evaluation of animal numbers and costs for in vivo tests to accomplish REACH legislation requirements for chemicals - a report by the transatlantic think tank for toxicology (t(4)).** *ALTEX* 2009, **26**(3):187-208.
- Sablina, A. A., Budanov, A. V., Ilyinskaya, G. V. *et al*: **The antioxidant function of the p53 tumor suppressor.** *Nat Med* 2005, **11**(12):1306-1313.
- Sachs, L.: **Statistische Entscheidungstechnik. 7. Auflage** Springer 1991.
- Samet, J. M., Hatch, G. E., Horstman, D. *et al*: **Effect of antioxidant supplementation on ozone-induced lung injury in human subjects.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **164**(5):819-825.
- Sander, R.: **Compilation of Henry's law constants, version 3.99.** *Atmos Chem Phys Discuss* 2014, **14**(21):29615-30521.
- Sanmartin-Suarez, C., Soto-Otero, R., Sanchez-Sellero, I. *et al*: **Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants.** *J Pharmacol Toxicol Methods* 2011, **63**(2):209-215.
- Santrock, J., Gorski, R. A., O'Gara, J. F.: **Products and mechanism of the reaction of ozone with phospholipids in unilamellar phospholipid vesicles.** *Chem Res Toxicol* 1992, **5**(1):134-141.
- Schoenbein, C. F.: **Recherches sur la nature de l'odeur qui se manifeste dans certaines actions chimiques;** 1913.
- Schönbein, C. F.: **Über verschiedene Zustände des Sauerstoffs.** *Liebigs Ann Chem* 1854, **89**:257-300.
- Schuchmann, M. N., Von Sonntag, C.: **Reactions of ozone with D-glucose in oxygenated aqueous solution-direct action and hydroxyl radical pathway.** *Aqua* 1989, **38**(5):311-317.
- Steinritz, D., Mohle, N., Pohl, C. *et al*: **Use of the Cultex(R) Radial Flow System as an in vitro exposure method to assess acute pulmonary toxicity of fine dusts and nanoparticles with special focus on the intra- and inter-laboratory reproducibility.** *Chem Biol Interact* 2013, **206**(3):479-490.
- Strøm-Tejsen, P., Weschler, C. J., Wargocki, P. *et al*: **The influence of ozone on self-evaluation of symptoms in a simulated aircraft cabin.** *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2007, **18**(3):272-281.
- Sun, J., Zheng, J., Wang, G. *et al*: **Apoptotic effect of *Vibrio vulnificus* cytolysin on A549 human lung adenocarcinoma cells.** *Mol Med Rep* 2012, **5**(3):668-674.
- Sunil, V. R., Patel-Vayas, K., Shen, J. *et al*: **Classical and alternative macrophage activation in the lung following ozone-induced oxidative stress.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2012, **263**(2):195-202.

- Szmant, H. H.: **Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems.** *Ann N Y Acad Sci* 1975, **243**(1):20-23.
- Takeyama, N., Miki, S., Hirakawa, A. *et al*: **Role of the mitochondrial permeability transition and cytochrome C release in hydrogen peroxide-induced apoptosis.** *Exp Cell Res* 2002, **274**(1):16-24.
- Thorne, D., Kilford, J., Payne, R. *et al*: **Characterisation of a Vitrocell(R) VC 10 in vitro smoke exposure system using dose tools and biological analysis.** *Chem Cent J* 2013, **7**(1):146.
- Tinevez, J.-Y., Schulze, U., Salbreux, G. *et al*: **Role of cortical tension in bleb growth.** *Proc Natl Acad Sci* 2009, **106**(44):18581-18586.
- Triantaphyllopoulos, K., Hussain, F., Pinart, M. *et al*: **A model of chronic inflammation and pulmonary emphysema after multiple ozone exposures in mice.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011, **300**(5):L691-L700.
- Valacchi, G., Pagnin, E., Corbacho, A. M. *et al*: **In vivo ozone exposure induces antioxidant/stress-related responses in murine lung and skin.** *Free Radic Biol Med* 2004, **36**(5):673-681.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J. *et al*: **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** *Int J Biochem Cell Biol* 2007, **39**(1):44-84.
- Van Der Zee, J., Dubbelman, T. M., Raap, T. K. *et al*: **Toxic effects of ozone on murine L929 fibroblasts. Enzyme inactivation and glutathione depletion.** *Biochem J* 1987, **242**:707-712.
- Van der Zee, J., Van Beek, E., Dubbelman, T. M. *et al*: **Toxic effects of ozone on murine L929 fibroblasts. Damage to DNA.** *Biochem J* 1987, **247**(1):69.
- Voigt, S., Philipp, S., Davarnia, P. *et al*: **TRAIL-induced programmed necrosis as a novel approach to eliminate tumor cells.** *BMC Cancer* 2014, **14**(1):74.
- Von Sonntag, C., Von Gunten, U.: **Chemistry of Ozone in Water and Wastewater Treatment.** *IWA Publishing* 2012.
- Voter, K. Z., Whitin, J. C., Torres, A. *et al*: **Ozone exposure and the production of reactive oxygen species by bronchoalveolar cells in humans.** *Inhal Toxicol* 2001, **13**(6):465-483.
- Wang, J., Wang, S., Manzer, R. *et al*: **Ozone induces oxidative stress in rat alveolar type II and type I-like cells.** *Free Radic Biol Med* 2006, **40**(11):1914-1928.
- Wenzel, D. G., Wrobel, W. J., Kotek, J. J. *et al*: **An ozone-generating system and chamber for testing injury to cultured cells.** *Arch Environ Health* 1979, **34**(6):454-460.
- Wittlinger, M., Grabenbauer, G. G., Sprung, C. N. *et al*: **Time and dose-dependent activation of p53 serine 15 phosphorylation among cell lines with different radiation sensitivity.** *Int J Rad Biol* 2007, **83**(4):245-257.
- Xie, C., Zhang, N., Zhou, H. *et al*: **Distinct roles of basal steady-state and induced H-ferritin in tumor necrosis factor-induced death in L929 cells.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**(15):6673-6681.
- Xu, P., Janex, M.-L., Savoye, P. *et al*: **Wastewater disinfection by ozone: main parameters for process design.** *Water Res* 2002, **36**(4):1043-1055.

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Zelltodmarker in Ozon-exponierten A549 und L929 Zellen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

Danksagung

Am Ende dieser Dissertation ist es an der Zeit mich bei denjenigen zu bedanken, die mich in dieser herausfordernden, aber auch sehr lohnenden Phase meiner akademischen Laufbahn begleitet haben.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Privatdozent Harald Mückter für die Überlassung des Themas und seiner intensiven Betreuung und Unterstützung bei den praktischen und theoretischen Arbeiten verpflichtet. Vor allem behalte ich den Mittagskaffee und die verschiedenen Abende mit Diskussionen über die Dissertation hinaus, in Lokalitäten in und um München in großer Erinnerung.

Vieles bei dieser Arbeit wäre auch nicht ohne die große und herzliche Hilfe von Frau Christine Hopfer möglich gewesen. In einer sehr angenehmen Art und Weise, unterstützte Sie mich tatkräftig bei den praktischen Arbeiten im Labor.

Eine großartige Freundschaft hat sich im Labor durch die Zusammenarbeit mit Herrn Christian Juretschke entwickelt. An langen Arbeitstagen haben spezielle Versuche, gutes Bier und Diskussionen den Kopf freigemacht um motiviert weiterzumachen.

Das Trio der „Mückterbuam“ wurde durch Herrn Elias Bekka komplett. Auch ihm danke ich für die gute Zusammenarbeit. Wir beide waren die „Clowns“ im Labor die die „FACSen“ machten.

Meinen Freunden Veronika Hofstätter und Benedikt Kreuzpointner danke ich sehr für das kritische Durchlesen dieser Arbeit. Herr Kreuzpointner nimmt außerdem die Rolle des Vermittlers ein, da er den Kontakt zwischen Herrn Mückter und mir herstellte und mich auf die Idee brachte dort meine Doktorarbeit zu machen.

Eine herausragende Stellung in jeglicher Hinsicht nehmen meine Eltern und meine Freundin Katharina Hofmann ein. Ohne die liebevolle Fürsorge beider wäre diese Arbeit nicht zu dem Werk geworden welches sie heute ist.